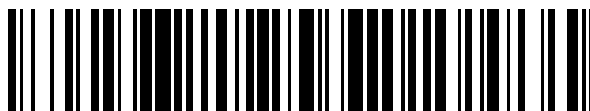


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 979**

51 Int. Cl.:

A61K 36/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2012 PCT/US2012/029636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12125998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2012 E 12757534 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2685995**

54 Título: **Composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury**

30 Prioridad:

17.03.2011 US 201161453656 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

**GLOBEIMMUNE, INC. (50.0%)
1450 Infinite Drive
Louisville, CO 80027, US y
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PALENA, CLAUDIA;
GUO, ZHIMIN;
APELIAN, DAVID y
SCHLOM, JEFFREY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo el Artículo 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º de Serie 61/453.656, presentada el 17 de marzo de 2011.

Derechos del gobierno

Esta invención se creó en el ejercicio de un Acuerdo Cooperativo de Investigación y Desarrollo con los Institutos Nacionales de Salud, una agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos. El Gobierno de los Estados Unidos posee ciertos derechos en esta invención.

10 Declaración relativa al acuerdo común de investigación

Esta invención se realizó por o en nombre de las partes de un Acuerdo Cooperativo de Investigación y Desarrollo, ejecutado el 8 de mayo de 2008. Las partes en el Acuerdo Cooperativo de Investigación y Desarrollo son: Globelimmune, Inc. y el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, representado por el Instituto Nacional del Cáncer, un Instituto, Centro o División de los Institutos Nacionales de Salud.

15 Referencia a una lista de secuencias

Esta solicitud contiene una Lista de Secuencias enviada electrónicamente como un archivo de texto por EFS-Web. El archivo de texto, denominado "3923-34-PCT_ST25", tiene un tamaño en bytes de 76 KB, y se registró el 13 de marzo de 2012. La información contenida en el archivo de texto se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad según el Artículo 37 CFR § 1.52(e)(5).

20 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones inmunoterapéuticas a base de levadura y a su uso en métodos para la prevención y/o tratamiento de cánceres caracterizados por la expresión o sobreexpresión de Brachyury.

Antecedentes de la invención

- 25 El Brachyury, también conocido como "T", es un factor de transcripción mesodérmico y miembro del complejo de genes de la caja T. El gen que codifica Brachyury (representado como gen T o gen Brachyury en seres humanos) fue identificado inicialmente en 1927 por Nadine Dobrovolskaia-Zavadskaja a través de una mutación en ratones que afectaba a la longitud de la cola y las vértebras sacras en animales heterocigotos. El gen Brachyury se clonó en ratones en 1990 por Hermann y colaboradores (Herrmann *et al.*, 1990, *Nature* 343: 617-622) y en seres humanos en 1996 por Edwards y colaboradores (Edwards *et al.*, 1996, *Genome Res.* 6: 226-223), quienes también describieron la secuencia de aminoácidos deducida para Brachyury humano.

- 35 Como un miembro de la familia de factores de transcripción de la caja T, Brachyury contiene el motivo de dominio de unión a ADN altamente conservado, llamado "caja T" o dominio T, que se une a una secuencia de consenso palíndroma. Se ha mostrado que Brachyury, igual que otras proteínas de la caja T, desempeña una función en el desarrollo temprano, y es vital para la formación y diferenciación de desarrollo axial y mesodérmico posterior en vertebrados (véanse, por ejemplo, Wilkinson *et al.*, 1990, *Nature* 343(6259): 657-659; Beddington *et al.*, 1992, *Development (Suppl.)*: 157-165; Schulte-Merker *et al.*, 1994, *Development* 120: 1009-1015; Kispert y Herrmann, 1994, *Dev. Biol.* 161: 179-193; Showell *et al.*, 2004, *Dev Dyn* 229: 201-218). Más recientemente, Palena y colaboradores han demostrado que Brachyury se expresa en una diversidad de tejidos tumorales humanos y líneas de células de cáncer y han mostrado que se pueden usar péptidos de Brachyury para generar líneas de linfocitos T específicas de Brachyury en donantes normales y pacientes de cáncer (Palena *et al.*, 2007, *Clin. Cancer Res.* 13(8): 2471-2478). Los estudios de Fernando *et al.* han mostrado que Brachyury promueve la transición epitelial-mesénquimal (EMT) en células tumorales humanas, confiriendo a las células tumorales un fenotipo mesénquimal, así como capacidades migratorias e invasivas, mientras que atenúa el avance del ciclo de las células tumorales (Fernando *et al.*, 2010, *J. Clin. Invest.* 120(2): 533-544). Por consiguiente, Brachyury está implicado en el avance metastático del cáncer.

- 50 El cáncer es una causa principal de muerte a nivel mundial, y el desarrollo de terapias eficaces para el cáncer continúa siendo una de las áreas más activas de investigación y desarrollo clínico. Aunque se han propuesto una diversidad de planteamientos innovadores para tratar y prevenir cánceres, muchos cánceres continúan teniendo una alta proporción de mortalidad y pueden ser difíciles de tratar o relativamente insensibles a las terapias convencionales. Los cánceres asociados con la expresión de Brachyury se pueden encontrar en una diversidad de tejidos, incluyendo mama, intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, ovario, testículos, pulmón, colon y próstata, e incluye cánceres metastáticos y de fase tardía. Además, Brachyury se expresa en tumores con origen en linfocitos T, tal como leucemia linfocítica crónica (CLL), linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr,

linfomas de Burkitt y de Hodgkin. Por lo tanto, parece que Brachyury juega un papel en un gran número de cánceres humanos. Aunque se ha propuesto Brachyury como una diana para la inmunoterapia del cáncer (véase, por ejemplo, Palena *et al.*, anteriormente, Fernando *et al.*, anteriormente, y el documento WO 2008/106551), puesto que es una diana de cáncer relativamente nueva, sigue existiendo la necesidad en la técnica de nuevos productos inmunoterapéuticos que traten y/o prevengan de manera eficaz los cánceres asociados con la expresión o sobreexpresión de Brachyury.

Compendio de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. Una realización de la invención se refiere al compuesto reivindicado para su uso en un método para reducir, detener, invertir, retrasar o prevenir el avance metastático del cáncer en un individuo que tiene cáncer. El método incluye la etapa de administrar a un individuo que tiene un cáncer que está experimentando un avance metastático, que está en riesgo de padecer avance metastático, o se predice que empieza a padecer avance metastático, una composición inmunoterapéutica que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury. Otra realización de la invención se refiere al uso de una composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury para reducir, detener, invertir o prevenir el avance del cáncer en un individuo que tiene cáncer.

En un aspecto, no se detecta Brachyury en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición. En un aspecto, se detecta expresión de Brachyury en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición. El individuo puede tener cáncer de estadio I, cáncer de estadio II, cáncer de estadio III o cáncer de estadio IV.

Otro caso de la descripción que comprende la invención se refiere a un método para prevenir o retrasar la aparición de un cáncer que expresa Brachyury. El método incluye la etapa de administrar a un individuo una composición inmunoterapéutica que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury. Otro caso se refiere al uso de una composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury para prevenir o retrasar la aparición de un cáncer que expresa Brachyury.

En un aspecto de estos casos, no se ha detectado cáncer en el individuo. En un aspecto, el individuo está en alto riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, a través de predisposición genética). En un aspecto, el individuo tiene una lesión precancerosa.

En un aspecto de estos casos, el individuo tiene cáncer, pero no se han detectado células cancerosas de expresión de Brachyury en el cáncer. En un aspecto, el cáncer aún no es metastático. En un aspecto, el cáncer tiene un alto riesgo de metástasis. En un aspecto, el sujeto tiene cáncer de estadio I. En un aspecto, el sujeto tiene cáncer de estadio II.

Otro caso de la descripción se refiere a un método para reducir o prevenir la resistencia a la quimioterapia o resistencia a la radiación de las células tumorales en un paciente con cáncer. El método incluye la etapa de administrar a un individuo que tiene cáncer y está recibiendo quimioterapia y/o terapia de radiación una composición inmunoterapéutica que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury. Otro caso de la descripción se refiere al uso de una composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury para reducir o prevenir la resistencia a la quimioterapia o la resistencia a la radiación de las células tumorales en un paciente con cáncer. En un aspecto, no se detecta Brachyury en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición. En un aspecto, se detecta expresión de Brachyury en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición.

Aún otro caso de la descripción, se refiere a un método para tratar cáncer. El método incluye las etapas de: (a) administrar a un individuo que tiene cáncer en el que no se ha detectado la expresión de Brachyury, una primera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un primer antígeno de cáncer que no comprende un antígeno Brachyury; y (b) administrar al individuo, antes de, concurrentemente con, secuencialmente con, o posterior a, la administración de la primera composición inmunoterapéutica, una segunda composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un segundo antígeno de cáncer que comprende un antígeno Brachyury. En un aspecto, el método comprende además, en la etapa (a), administrar una o más composiciones inmunoterapéuticas adicionales, en donde cada una de la una o más composiciones inmunoterapéuticas adicionales comprende un antígeno de cáncer adicional. En un aspecto de cualquier caso anterior, el antígeno de cáncer se selecciona de: Ras mutado, antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, poliposis adenomatosa del colon (APC), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógeno (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-flt-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina, y NGEP. En un aspecto, el antígeno de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: Ras mutado, antígeno carcinoembrionario (CEA), y MUC-1. Otro caso de la descripción se refiere al uso de una combinación de composiciones inmunoterapéuticas para tratar cáncer,

comprendiendo las composiciones inmunoterapéuticas: (a) una primera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un primer antígeno de cáncer que no comprende un antígeno Brachyury; y (b) una segunda composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un segundo antígeno de cáncer que comprende un antígeno Brachyury.

- 5 Aún otro caso de la descripción se refiere a un método para tratar cáncer. El método incluye las etapas de: (a) administrar a un individuo que tiene cáncer una primera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno Ras mutado; (b) administrar al individuo de (a) una segunda composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario (CEA) y mucina-1 (MUC-1); y (c) administrar al individuo de (a) y (b) una tercera
10 composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno Brachyury. En un aspecto, las etapas de administración en (a), (b) y (c) son concurrentes. Otro caso de la descripción se refiere al uso de una combinación de composiciones inmunoterapéuticas para tratar cáncer, comprendiendo las composiciones inmunoterapéuticas: (a) una primera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno Ras mutado; (b) una segunda composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario (CEA) y mucina-1 (MUC-1); y (c)
15 una tercera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno Brachyury.

En cualquiera de los casos o aspectos de la invención descritos anteriormente o en otra parte en la presente memoria, cuando el individuo tiene cáncer o una lesión precancerosa, en un aspecto de la invención, el individuo se está tratando o se ha tratado con otra terapia para el cáncer. Por ejemplo, tal terapia puede incluir, pero no se limita a, quimioterapia, terapia dirigida contra el cáncer, terapia de radiación, transferencia adoptiva de linfocitos T, y/o administración de una o más composiciones inmunoterapéuticas adicionales. En un aspecto, una composición inmunoterapéutica adicional comprende un vehículo de levadura y un segundo antígeno de cáncer que no incluye antígeno Brachyury. El segundo antígeno de cáncer puede incluir, pero no se limita a, Ras mutado, antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, poliposis adenomatosa del colon (APC), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógeno (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina, y NGEP. En un aspecto, el segundo antígeno de cáncer se selecciona de entre: Ras mutado, antígeno carcinoembrionario (CEA), y MUC-1.

- 30 En un aspecto de cualquiera de los casos o aspectos de la invención descritos anteriormente o en otra parte en la presente memoria, el método o uso reduce la carga tumoral en el individuo, incrementa la supervivencia del individuo, y/o inhibe el crecimiento tumoral en el individuo.

En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente o en otra parte en la presente memoria, el método comprende además la resección quirúrgica de un tumor del individuo.

- 35 En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente o en otra parte en la presente memoria, el cáncer tiene su origen en las células epiteliales. En un aspecto, el cáncer puede incluir, pero no se limita a, cáncer de mama, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, o cánceres metastáticos de los mismos.

En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente o en otra parte en la presente memoria, el antígeno Brachyury es Brachyury humano de longitud completa. En un aspecto, el antígeno Brachyury no es Brachyury de longitud completa. En un aspecto, el antígeno Brachyury tiene una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18, o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende desde al menos la posición 1 o 2 hasta entre la posición 255 y el extremo C de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18, o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende desde al menos la posición 1 o 2 hasta entre la posición 430 y el extremo C de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18, o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende las posiciones 246 a 254 de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18, o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:6, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:18, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:18, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:18. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:2, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:6, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:18, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:18, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:18. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:2, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno de cáncer tiene al menos 25 aminoácidos de longitud. En un aspecto, el antígeno Brachyury tiene al menos 25 aminoácidos de longitud. En un aspecto, el antígeno Brachyury es mayor de

30 aminoácidos de longitud. En un aspecto, el antígeno de cáncer comprende dos o más dominio inmunógenos de Brachyury.

En un aspecto de cualquiera de la invención descrita anteriormente o en otra parte en la presente memoria, el antígeno de cáncer es una proteína de fusión. En un aspecto, la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:8, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:8. En un aspecto, la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:20, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:20.

Otro caso de la descripción que comprende la invención se refiere a una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury, en donde la composición inmunoterapéutica comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno expresado por el vehículo de levadura y que comprende al menos un antígeno Brachyury, en donde el antígeno Brachyury comprende más de 30 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende desde al menos la posición 1 o 2 hasta entre la posición 255 y el extremo C de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende desde al menos la posición 1 o 2 hasta entre la posición 430 y el extremo C de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende las posiciones 246 a 254 de la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:6, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:18, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:18, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:18. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:2, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:6, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:18, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:18, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:18. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:2, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En un aspecto, el antígeno de cáncer es una proteína de fusión. En un aspecto, la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos que es SEQ ID NO:8 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:8. En un aspecto, la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:20. En un aspecto, el vehículo de levadura es una levadura entera. En un aspecto, la levadura entera está inactivada por calor.

Aún otro caso de la descripción que comprende la invención se refiere a una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury que comprende: (a) una levadura inactivada entera; y (b) una proteína de fusión de Brachyury que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:6. La expresión de la proteína de fusión de Brachyury está bajo el control del promotor *CUP1*, la proteína de fusión de Brachyury se expresa por la levadura, y la composición produce una respuesta de linfocitos T específica de Brachyury. En un aspecto, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8.

Aún otro caso de la descripción que comprende la invención se refiere a una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury que comprende: (a) una levadura inactivada entera; y (b) una proteína de fusión de Brachyury que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:18. La expresión de la proteína de fusión de Brachyury está bajo el control del promotor *CUP1*, la proteína de fusión de Brachyury se expresa por la levadura, y la composición produce una respuesta de linfocitos T específica de Brachyury. En un aspecto, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20.

En un aspecto de cualquiera de los casos o aspectos de la invención descritos anteriormente o en otra parte en la presente memoria, el vehículo de levadura es una levadura entera. En un aspecto, la levadura entera es aniquilada. En un aspecto, la levadura entera está inactivada por calor. En un aspecto, la levadura expresa el antígeno. En un aspecto, la levadura es de un género seleccionado del grupo que consiste en: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*. En un aspecto, la levadura es de *Saccharomyces*. En un aspecto, la levadura es de *Saccharomyces cerevisiae*.

En un aspecto de cualquiera de los casos de la descripción que comprende la invención descritos anteriormente o en otra parte en la presente memoria, la composición se formula en un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para su administración a un sujeto.

Aún otro caso de la descripción que comprende la invención se refiere al uso de cualquiera de las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury descritas en la presente memoria para tratar una enfermedad. En un aspecto, la enfermedad es cáncer. En un aspecto, la enfermedad está asociada a un agente infeccioso. En un aspecto, la enfermedad está asociada a un virus o infección vírica. Tal virus puede incluir, pero sin limitarse a, virus Epstein Barr (EBV).

Otro caso de la descripción que comprende la invención se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada a una infección por virus Epstein Barr (EBV). El método incluye la etapa de administrar a un individuo cualquiera de las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury descritas en la presente memoria.

- 5 Aún otro caso de la descripción que comprende la invención se refiere a un método para producir una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury. El método incluye las etapas de: (a) cultivar levadura que se ha transformado con una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un antígeno Brachyury bajo el control de un promotor *CUP1* en un medio adecuado en ausencia de CuSO_4 hasta que la levadura alcanza una fase de crecimiento semilogarítmica; (b) inducir la expresión del antígeno Brachyury en la levadura añadiendo CuSO_4 al medio; (c) cultivar la levadura después de la etapa (b) durante hasta entre 6 y 8 horas; y (d) recolectar la levadura. En un aspecto, la levadura en la etapa (a) se cultiva a una densidad celular de entre 1,0 y 2,0 Y.U. por mililitro de volumen total de cultivo. En un aspecto, la levadura en la etapa (a) se cultiva a una densidad celular de entre 1,0 y 1,5 Y.U. por mililitro de volumen total de cultivo. En un aspecto, la levadura se cultiva en las etapas (a)-(c) en un medio de cultivo donde el pH se mantiene a pH 5,5 o superior. En un aspecto, el método incluye adicionalmente una etapa de inactivar térmicamente la levadura después de la etapa (d). Por ejemplo, en un aspecto, la levadura se inactiva térmicamente a aproximadamente 56 °C durante aproximadamente 1 hora. En un aspecto adicional de este caso, la levadura se puede formular para inyección con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la levadura es de *Saccharomyces*. En un aspecto, la levadura es de *Saccharomyces cerevisiae*.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La figura 1A es una imagen digitalizada de una transferencia Western que muestra la detección por anti-Brachyury de la expresión de Brachyury en una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury, con ambos medios U2 y UL2.

- La figura 1B es una imagen digitalizada de una transferencia Western que muestra la detección por anti-His de la expresión de Brachyury en una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury, con ambos medios U2 y UL2.

- La figura 2 es una imagen digitalizada de una transferencia Western que muestra la expresión de Brachyury en una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury donde se variaron la densidad celular en la inducción del antígeno y el tiempo para la recolección después de la inducción del antígeno.

- 30 Las figuras 3A-3C son gráficas que muestran que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dos de los tres donantes sanos sometidos a impulsos con levadura-Brachyury durante dos ciclos de estimulación, seguidos de estimulación con impulsos con péptido CTL de Brachyury, fueron capaces de generar CTL CD8^+ que pueden aniquilar células de carcinoma SW480 (positivas a HLA-A2/alto Brachyury), con una lisis mínima de carcinoma MCF7 (positivo a HLA-A2/Brachyury bajo), (figura 3A, donante 07706, figura 3B, donante 17663; figura 3C, donante 26532).

- 35 La figura 4A es una gráfica que muestra que los linfocitos T específicos de Brachyury de las PBMC de donantes sanos estimuladas con una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury lisan específicamente células tumorales que tienen la MHC apropiada (SW480, positivas a HLA-A2/Brachyury alto) frente a células de carcinoma H226 (negativas a HLA-A2/Brachyury alto).

- 40 La figura 4B es una gráfica que muestra la expresión de ARNm de Brachyury con relación a la de un gen de control (GAPDH) en células tumorales SW480 y H226 usadas en el experimento mostrado en la figura 4A.

La figura 5 es una gráfica que muestra la proliferación de linfocitos T CD4^+ aislados del bazo de ratones que se vacunaron con levadura-Brachyury (GI-6301, círculos) o levadura de control (control de levadura, triángulos), en respuesta a las dosis indicadas de proteína purificada de Brachyury o proteína β -gal de control.

- 45 La figura 6 es una gráfica que muestra que la administración de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury (GI-6301, círculos) de la invención muestra una tendencia hacia la reducción de tumores que expresan Brachyury en ratones en comparación con ratones que reciben levadura en solitario (sin antígeno Brachyury).

Las figuras 7A y 7B son análisis por citometría de flujo que muestran que la línea de linfocitos T específicos de Brachyury, T-2-BR-A, se une a un tetrámero de HLA-A2 específico de Brachyury (figura 7B) y no a un tetrámero de control (figura 7A).

- 50 La figura 8 es un análisis por citometría de flujo que muestra la expresión de perforina en la línea de linfocitos T específicos de Brachyury T, T-2-BR-A, después de la estimulación con linfocitos B autólogos sometidos a impulsos con péptido agonista de Brachyury.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere en general a composiciones inmunoterapéuticas a base de levadura y a métodos para la

prevención y/o tratamiento de cánceres que expresan o sobreexpresan Brachyury. La invención incluye el uso de una composición inmunoterapéutica a base de levadura (también denominada como una inmunoterapia a base de levadura) que comprende un vehículo de levadura y antígenos Brachyury o dominios inmunógenos de los mismos (también denominado en la presente memoria "inmunoterapia de levadura-Brachyury" o "composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury"). Los inventores describen en la presente memoria la construcción y producción de nuevos productos de inmunoterapia de levadura-Brachyury, y demuestran que la inmunoterapia de levadura-Brachyury expande linfocitos T específicos de Brachyury, incluyendo CTL CD8⁺, de individuos normales y de pacientes con cáncer. Además, los ratones inmunizados con composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury generaron respuestas de linfocitos T específicos de Brachyury *in vivo*, y se inhibió el crecimiento tumoral de expresión de Brachyury en estos ratones. Tomados conjuntamente, los datos presentados en la presente memoria muestran que la inmunoterapia de levadura-Brachyury es útil para la producción de respuestas inmunitarias celulares específicas de Brachyury (CD4⁺ y CD8⁺) y para la prevención y tratamiento de tumores que expresan Brachyury, ofreciendo una nueva terapia para la prevención y/o tratamiento de cánceres metastáticos y afecciones asociadas.

Las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury útiles en la presente invención se adaptan de manera única para seleccionar como objetivo de manera específica cánceres que expresan Brachyury por varias razones. En primer lugar, Brachyury está implicado en procesos de EMT, y por lo tanto, sin quedar ligado a la teoría, los inventores creen que desempeña una función en los tumores de fase tardía y en los procesos metastáticos. Por consiguiente, en un aspecto de la invención, la inmunoterapia de levadura-Brachyury es eficaz en el direccionamiento de células tumorales antes o en el momento durante el cual empiezan a adquirir motilidad e invadir otros tejidos, previniendo, inhibiendo, deteniendo, invirtiendo o retrasando de este modo la aparición del cáncer metastático y/o el avance del cáncer, y especialmente cáncer metastático. Hay una gran necesidad de terapias eficaces para cánceres de fase tardía, especialmente cánceres metastáticos, que pueden tener pocas opciones de tratamiento una vez que ha fallado la terapia convencional de cáncer. La levadura-Brachyury presenta un nuevo planteamiento para tratar estos cánceres, o para retrasar, inhibir, invertir o prevenirlos conjuntamente. Además, la inmunoterapia de levadura-Brachyury se puede usar para prevenir o retrasar cáncer metastático o el avance de cáncer en individuos que tienen cáncer de fase temprana. La terapia es útil, en una realización, en cánceres que tienen una alta proporción de progreso metastático, y puede ser útil para detener el avance del cáncer. Además, la inmunoterapia de levadura-Brachyury es útil en individuos que tienen una lesión precancerosa (preneoplásica) o tumor, en individuos que están en alto riesgo de desarrollar un cáncer, particularmente uno que tiene una alta proporción de metástasis, e incluso en individuos normales como un agente profiláctico para la prevención de cáncer, que se puede usar junto con otra inmunoterapia profiláctica para cáncer, tal como se describe en la presente memoria.

También la inmunoterapia de levadura-Brachyury proporciona un beneficio a individuos que se están sometiendo a otra terapia para cáncer, incluyendo quimioterapia y terapia de radiación. Más particularmente, se sabe que en algunos casos los cánceres metastáticos son más resistentes a quimioterapia y/o terapia de radiación que los cánceres primarios. Por lo tanto, las composiciones de inmunoterapia de levadura-Brachyury de la invención pueden ser útiles para inhibir o reducir o eliminar la resistencia a quimioterapia o resistencia a radiación que puede presentarse en cáncer metastático al inhibir la expresión de Brachyury en el cáncer (e inhibir de este modo las influencias anti-proliferativas), y las composiciones de la invención pueden mejorar el rendimiento de la quimioterapia o de la terapia de radiación en un individuo.

También se puede usar inmunoterapia de levadura-Brachyury para tratar afecciones o enfermedades asociadas con la expresión de Brachyury que pueden ser de naturaleza no oncológica, o que puede preceder a una transformación maligna. Por ejemplo, Brachyury se puede regular en aumento en células que están infectadas con un agente infeccioso, por ejemplo, un virus tal como el Virus de Epstein Barr (EBV). Por consiguiente, la inmunoterapia de levadura-Brachyury se puede usar para tratar o prevenir cualquier enfermedad o afección asociada con la expresión de Brachyury, que incluye, pero se no limita a, enfermedades infecciosas, tal como infección vírica, incluyendo, pero no limitado a, afecciones asociadas a EBV (por ejemplo, mononucleosis).

La inmunoterapia de levadura-Brachyury es también fácilmente adaptable al uso de antígenos tumorales adicionales dentro de la misma composición de levadura, o al uso en combinación con otros productos inmunoterapéuticos a base de levadura que se dirigen a otros antígenos tumorales (de manera secuencial o concurrentemente) u otros productos inmunoterapéuticos y tratamientos/terapias para el cáncer. Por consiguiente, la inmunoterapia de levadura-Brachyury se puede adaptar al tipo de cáncer, el estadio del cáncer, el grado del cáncer, los antígenos expresados por el tumor, y el estado médico general del individuo (es decir, la terapia se personaliza fácilmente), y para el individuo que ya tiene cáncer, su uso se puede modificar a medida que el cáncer avanza en un individuo, a fin de proporcionar una eficiencia máxima en una diversidad de estadios de tumor. La inmunoterapia de levadura-Brachyury ofrece la oportunidad de diseñar planteamientos sofisticados, individualizados y eficaces para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de base amplia de una amplia gama de cánceres.

Las composiciones de levadura-Brachyury descritas en la presente memoria inducen respuestas inmunitarias innatas, así como respuestas inmunitarias adaptables contra el antígeno diana (Brachyury), incluyendo respuestas de linfocitos T TH17 y TH1 dependientes de CD4 y respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas de antígeno, que incluyen respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL), todos sin el uso de adyuvantes exógenos, citocinas, u otras

moléculas inmunoestimuladoras, muchas de las cuales tienen problemas de toxicidad. Además, las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury inhiben los números de linfocitos T reguladores (Treg) y/o la funcionalidad, mejorando de este modo las respuestas de linfocitos T efectores que se pueden suprimir normalmente por la presencia del tumor, por ejemplo. Además, en comparación con composiciones inmunoterapéuticas que inmunizan al generar respuestas de anticuerpos, se cree que las fuertes respuestas inmunitarias celulares, específicas del antígeno, y de base amplia producidas por la inmunoterapia de levadura-Brachyury son particularmente eficaces en el direccionamiento de células tumorales. De hecho, numerosos estudios han mostrado que se mejoran los planteamientos inmunoterapéuticos cuando las células tumorales se dirigen a través de los CTL CD8⁺ que reconocerán péptidos tumorales en el contexto de moléculas de MHC clase I.

La inmunoterapia de levadura-Brachyury es altamente capaz de activar las células que presentan el antígeno, y tiene la capacidad única de cebar de forma cruzada la respuesta inmunitaria, generando respuestas de CTL CD8⁺ que son típicamente eficaces contra tumores, haciendo aún frente a lo que de otro modo puede ser un entorno supresor. Puesto que este tipo de inmunoterapia utiliza la capacidad natural de la célula que presenta el antígeno para presentar inmunógenos pertinentes, no es necesario conocer la identidad precisa de los epítomos CTL o epítomos de MHC clase II de Brachyury para producir un producto inmunoterapéutico eficaz según la presente invención. De hecho, múltiples epítomos de linfocitos T⁺ CD4⁺ y CD8⁺ se pueden dirigir en una única composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury, y de este modo los productos inmunoterapéuticos de levadura-Brachyury de la invención no se limitan al uso de péptidos cortos y en realidad, es eficaz el uso de péptidos más largos y de proteínas de fusión en estas composiciones. Por consiguiente, usando la inmunoterapia de levadura-Brachyury, se elimina el uso de algoritmos y fórmulas complejas para identificar epítomos putativos de linfocitos T.

Además, puesto que Brachyury no se expresa por la mayoría de los tejidos normales (no tumorales), y típicamente se sobreexpresa en las células tumorales, cualquier efecto "fuera de diana" relacionado con los tejidos normales no es de interés. Como se ha mencionado anteriormente, la levadura-Brachyury se puede utilizar de manera eficaz en un protocolo de inmunización (profiláctico o terapéutico) sin el uso de adyuvantes exógenos, agentes o moléculas inmunoestimuladoras, moléculas coestimuladoras, o citocinas, aunque dichos agentes se pueden incluir, si se desea. Además, la inmunoterapia de levadura-Brachyury se puede administrar repetidamente sin perder eficiencia, ya que puede ser problemática con otros tipos de inmunoterapia.

Composiciones de la invención

Un caso de la presente invención se refiere a una composición de inmunoterapia a base de levadura que se puede usar para prevenir y/o tratar cánceres caracterizados por la expresión o sobreexpresión de Brachyury (incluyendo cánceres que pueden no contener células que expresen inicialmente Brachyury detectable, pero que pueden contener o contendrán células que expresan Brachyury en estadios posteriores del desarrollo del cáncer). La composición es una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende uno o más antígenos Brachyury y/o dominios inmunógenos de los mismos. El antígeno Brachyury o dominio inmunógeno del mismo se expresa mucho más típicamente como una proteína recombinante por el vehículo de levadura (por ejemplo, por una levadura intacta o esferoplasto de levadura, que se puede procesar además opcionalmente en un citoplasto de levadura, fantasma de levadura, o extracto de membrana de levadura o fracción de los mismos), aunque es una realización de la invención que se carguen uno o más antígenos Brachyury en un vehículo de levadura o se vuelvan de otro modo complejos, se unan a, se mezclan con, o se administre con un vehículo de levadura como se describe en la presente memoria para formar una composición de la presente invención.

Una "composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury" es un tipo específico de "composición inmunoterapéutica a base de levadura" que contiene al menos un antígeno Brachyury o dominio inmunógeno del mismo. La expresión "composición inmunoterapéutica a base de levadura" se puede usar de manera intercambiable con "producto de inmunoterapia a base de levadura", "composición de inmunoterapia a base de levadura", "composición a base de levadura", "inmunoterapéutico a base de levadura", "vacuna a base de levadura", o derivados de estas expresiones. Una "composición inmunoterapéutica" es una composición que produce una respuesta inmunitaria suficiente para lograr al menos un efecto terapéutico en un sujeto. Como se usa en la presente memoria, la composición inmunoterapéutica a base de levadura se refiere a una composición que incluye un componente de vehículo de levadura y que produce una respuesta inmunitaria suficiente para lograr al menos un beneficio terapéutico en un sujeto. Más particularmente, una composición inmunoterapéutica a base de levadura es una composición que incluye un componente de vehículo de levadura y típicamente, un componente de antígeno, y puede producir o inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria celular, que incluye sin limitación una respuesta inmunitaria celular mediada por linfocitos T. En un aspecto, una composición inmunoterapéutica a base de levadura útil en la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8⁺ y/o CD4⁺ y en un aspecto, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, particularmente contra un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de cáncer). Una respuesta inmunitaria de CD4⁺ puede incluir respuestas inmunitarias TH1, respuestas inmunitarias TH2, respuestas inmunitarias TH17, o cualquier combinación de las anteriores. Los productos inmunoterapéuticos a base de levadura son particularmente capaces de generar respuestas TH1 y TH17. Una respuesta inmunitaria CD8⁺ puede incluir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), y los productos inmunoterapéuticos a base de levadura son capaces de generar dichas respuestas. En un aspecto, una composición inmunoterapéutica a base de levadura modula el número y/o

funcionalidad de linfocitos T reguladores (Treg) en un sujeto. La inmunoterapia a base de levadura también se puede modificar para promover un tipo de respuesta con respecto a otra, por ejemplo, por la adición de citocinas, anticuerpos, y/o al modular el proceso de producción para la levadura. Opcionalmente, una composición inmunoterapéutica a base de levadura es capaz de producir una respuesta inmunitaria humoral.

5 Las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury de la invención pueden ser "profilácticas" o "terapéuticas". Cuando se proporcionan de manera profiláctica, las composiciones de la presente invención se proporcionan por adelantado en el desarrollo de, o la detección del desarrollo de, un cáncer que expresa Brachyury, con el fin de prevenir, inhibir o retrasar el desarrollo de tumores que expresan Brachyury; y/o prevenir, inhibir o retrasar la migración tumoral y/o la invasión tumoral de otros tejidos (metástasis) y/o, prevenir o inhibir en general el avance del cáncer en un individuo. Como se analiza en la presente memoria, se expresa Brachyury en varios
10 cánceres, que incluyen cánceres de fase tardía, y se ha mostrado que está implicado en el proceso de EMT, que es un proceso asociado con la invasión y migración de tumores, tal como en cáncer metastático. Por lo tanto, se pueden administrar composiciones profilácticas a individuos que parecen estar libres de cáncer (individuos sanos o normales), a individuos con (lesiones precancerosas) preneoplásicas, y también a individuos que tienen cáncer, pero en los que aun no se ha detectado Brachyury (es decir, antes de la expresión de Brachyury por las células tumorales en el cáncer). Los individuos que están en alto riesgo de desarrollar un cáncer, particularmente un cáncer con el que se asocia típicamente la expresión y/o metástasis de Brachyury, se pueden tratar profilácticamente con una composición de la invención. Cuando se proporcionan de manera terapéutica, las composiciones de inmunoterapia se proporcionan a un individuo con un cáncer que expresa Brachyury, con el fin de mejorar el cáncer, tal como al
20 reducir la carga tumoral en el individuo; inhibir el crecimiento tumoral en el individuo; aumentar la supervivencia del individuo; prevenir, inhibir, invertir o retrasar el desarrollo de la migración tumoral y/o invasión tumoral de otros tejidos (cáncer metastático) y/o prevenir, inhibir, invertir o retrasar el progreso del cáncer en el individuo. En un aspecto, se usa terapéuticamente la inmunoterapia de levadura-Brachyury para inhibir, reducir o eliminar la resistencia a quimioterapia o resistencia a radiación que puede presentarse en cáncer metastático al inhibir la expresión de Brachyury en el cáncer, y las composiciones de la invención para mejorar el rendimiento de la quimioterapia o terapia de radiación en un individuo.

Típicamente, una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury incluye un vehículo de levadura y al menos un antígeno de cáncer que comprende un antígeno Brachyury o dominio inmunógeno del mismo, donde el antígeno de cáncer se expresa por, se une a, se carga en, o se mezcla con el vehículo de levadura. En algunos casos, el
30 antígeno de cáncer, antígeno Brachyury, o dominio inmunógeno del mismo se proporciona como una proteína de fusión. Varias proteínas de Brachyury y proteínas de fusión adecuadas para su uso en las composiciones y métodos de la invención se describen más adelante. En algunos casos, el antígeno de cáncer y el antígeno Brachyury son el mismo elemento. En algunos casos, el antígeno de cáncer incluye otros antígenos, incluyendo otros antígenos de cáncer, además del antígeno Brachyury. En un aspecto de la invención, una proteína de fusión útil como un antígeno de cáncer puede incluir dos o más antígenos, por ejemplo, un antígeno Brachyury y otro antígeno de cáncer que no es un antígeno Brachyury, o dos diferentes antígenos Brachyury. En un aspecto, la proteína de fusión puede incluir dos o más dominios inmunógenos de uno o más antígenos, tal como dos o más dominios inmunógenos de un antígeno Brachyury, o dos o más epítomos de uno o más antígenos, tal como dos o más epítomos de un antígeno Brachyury.

40 Según la presente invención, un vehículo de levadura usado en una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury es cualquier célula de levadura (por ejemplo, una célula entera o intacta) o un derivado de la misma (véase más adelante) que se puede usar junto con uno o más antígenos, dominios inmunógenos de los mismos, o epítomos de los mismos en una composición de la invención (por ejemplo, una composición terapéutica o profiláctica). Por lo tanto, el vehículo de levadura puede incluir, pero no se limita a, microorganismo de levadura (entera) intacta viva (es decir, una célula de levadura que tiene todos sus componentes incluyendo una pared celular), un microorganismo de levadura aniquilada (muerta) o inactivada intacta, o derivados de levadura intacta que incluyen: un esferoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular), un citoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular y de núcleo), un fantasma de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular, de núcleo y de citoplasma), un
50 extracto de membrana subcelular de levadura o fracción del mismo (también denominado como una partícula de membrana de levadura y previamente como una partícula subcelular de levadura), cualquier otra partícula de levadura, o una preparación de pared celular de levadura.

Típicamente se producen esferoplastos de levadura por digestión enzimática de la pared celular de levadura. Tal método se describe, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1991, Meth. Enzymol. 194, 662-674., incorporado en la
55 presente memoria por referencia en su totalidad.

Típicamente los citoplastos de levadura se producen por enucleación de células de levadura. Tal método se describe, por ejemplo, en Coon, 1978, Natl. Cancer Inst. Monogr. 48, 45-55, incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Típicamente se producen fantasmas de levadura sellando de nuevo una pared permeabilizada o lisada y pueden
60 contener, pero no necesariamente, al menos algunos de los organelos de esa célula. Tal método se describe, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1983, J. Biol. Chem. 258, 3608-3614 y Bussey *et al.*, 1979, Biochim. Biophys. Acta

553, 185-196, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Una partícula de membrana de levadura (extracto de membrana subcelular de levadura o fracción del mismo) se refiere a una membrana de levadura que carece de un núcleo o citoplasma natural. La partícula puede ser de cualquier tamaño, incluyendo tamaños que varían del tamaño de una membrana natural de levadura a micropartículas producidas por sonicación u otros métodos de alteración de membrana conocidos por los expertos en la técnica, seguido por resellado. Se describe un método para producir extractos de membrana subcelulares de levadura, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1991, Meth. Enzymol. 194, 662-674. También se pueden usar fracciones de partículas de membrana de levadura que contienen porciones de membrana de levadura y, cuando el antígeno u otra proteína se expresó de forma recombinante por la levadura antes de la preparación de las partículas de membrana de levadura, el antígeno u otra proteína de interés. Los antígenos u otras proteínas de interés se pueden llevar dentro de la membrana, en cualquier superficie de la membrana, o combinaciones de los mismos (es decir, la proteína puede estar tanto dentro como fuera de la membrana y/o abarcar la membrana de la partícula de membrana de levadura). En una realización, una partícula de membrana de levadura es una partícula recombinante de membrana de levadura que puede ser una membrana de levadura intacta, alterada o alterada y liberada que incluye al menos un antígeno deseado u otra proteína de interés en la superficie de la membrana o al menos parcialmente incrustada dentro de la membrana.

Un ejemplo de una preparación de pared celular de levadura es una preparación de paredes celulares aisladas de levadura que tienen un antígeno en su superficie o al menos parcialmente incrustado dentro de la pared celular de tal forma que la preparación de pared celular de levadura, cuando se administra a un mamífero, estimula una respuesta inmunitaria deseada contra una diana de enfermedad

Se puede usar cualquier cepa de levadura para producir un vehículo de levadura de la presente invención. La levadura es un microorganismo unicelular que pertenece a una de las tres clases: Ascomycetes, Basidiomycetes y Fungi Imperfecti. Una consideración para la selección de un tipo de levadura para su uso como un modulador inmunitario es la patogenicidad de la levadura. En una realización, la levadura es una cepa no patógena, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. La selección de una cepa no patógena de levadura minimiza cualquier efecto adverso al individuo al que se administra el vehículo de levadura. Sin embargo, se puede usar una levadura patógena si la patogenicidad de la levadura se puede anular por cualquier medio conocido por el experto en la técnica (por ejemplo, cepas mutantes). Según un aspecto de la presente invención, se usan cepas no patógenas de levadura.

Los géneros de las cepas de levadura que se pueden usar en la invención incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces*, *Candida* (que puede ser patógena), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*. En un aspecto, los géneros de levadura se seleccionan de *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* o *Schizosaccharomyces*, y en un aspecto, se usa *Saccharomyces*. Las especies de cepas de levaduras que pueden usarse en la invención incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefir*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Yarrowia lipolytica*. Se ha de apreciar que varias de estas especies incluyen una diversidad de subespecies, tipos, subtipos, etc., que pretenden incluirse dentro de las especies mencionadas anteriormente. En un aspecto, la especie de levadura usada en la invención incluyen *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* y *S. pombe*. *S. cerevisiae* es útil ya que es relativamente fácil de manipular y que es "generalmente reconocido como seguro" o "GRAS" para su uso como aditivos alimentarios (GRAS, Norma propuesta por la FDA 62FR18938, 17 de abril de 1997). Una realización de la presente invención es una cepa de levadura que es capaz de replicar plásmidos en un número de copias particularmente alto, tal como una cepa de *S. cerevisiae*. La cepa de *S. cerevisiae* es una cepa que es capaz de soportar vectores de expresión que permiten que se expresen a alto niveles uno o más antígenos diana y/o proteínas de fusión de antígeno y/o otras proteínas. Otra cepa de levadura que es útil en la invención es *Saccharomyces cerevisiae* W303α. Además, se puede usar cualquier cepa mutante de levadura en la presente invención, incluyendo aquellas que muestran modificaciones post-traduccionales reducidas de antígenos diana expresados u otras proteínas, tal como mutaciones en las enzimas que extienden la glicosilación ligada a N.

La composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury de la invención incluye al menos un antígeno de cáncer que comprende un antígeno Brachyury. Según la presente invención, el uso general en la presente memoria del término "antígeno" se refiere: a cualquier porción de una proteína (por ejemplo, péptido, proteína parcial, proteína de longitud completa), en donde la proteína se presenta de forma natural o se deriva o se diseña de manera sintética, a una composición celular (célula entera, lisado celular o células alteradas), a un organismo (organismo entero, o lisado o células alteradas) o a un carbohidrato, u otra molécula, o una porción de los mismos. Un antígeno puede inducir una respuesta inmunitaria específica del antígeno (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células) contra los mismos o similares antígenos que se encuentran por un elemento del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T, anticuerpos).

Un antígeno puede ser un antígeno tan pequeño como un epítipo individual, un dominio inmunógeno individual o más grande, y puede incluir múltiples epítipos o dominios inmunógenos. Como tal, el tamaño de un antígeno puede ser tan pequeño como aproximadamente 8-11 aminoácidos (es decir, un péptido) y tan grande como: una proteína

de longitud completa, un multímero, una proteína de fusión, una proteína quimérica, una célula entera, un microorganismo entero, o cualquier porción de los mismos (por ejemplo, fragmentos de proteína (polipéptidos), lisados de células enteras o extractos de microorganismos). Los antígenos útiles en el producto inmunoterapéutico de levadura-Brachyury de la presente invención son péptidos, polipéptidos, proteínas de longitud completa, multímeros, proteínas de fusión y proteínas quiméricas. Además, los antígenos pueden incluir carbohidratos, que se pueden cargar en un vehículo de levadura o en una composición de la invención. Se apreciará que en algunas realizaciones (por ejemplo, cuando el antígeno se expresa por el vehículo de levadura de una molécula de ácido nucleico recombinante), el antígeno es una proteína, proteína de fusión, proteína quimérica, o un fragmento de los mismos, en lugar de una célula entera o microorganismo. Para la expresión en levadura, un antígeno es de un tamaño mínimo capaz de ser expresado de manera recombinante en levadura si el antígeno es la proteína entera que se va expresar por la levadura, y típicamente tiene al menos o más de 25 aminoácidos de longitud, o al menos o más de 26, al menos o más de 27, al menos o más de 28, al menos o más de 29, al menos o más de 30, al menos o más de 31, al menos o más de 32, al menos o más de 33, al menos o más de 34, al menos o más de 35, al menos o más de 36, al menos o más de 37, al menos o más de 38, al menos o más de 39, al menos o más de 40, al menos o más de 41, al menos o más de 42, al menos o más de 43, al menos o más de 44, al menos o más de 45, al menos o más de 46, al menos o más de 47, al menos o más de 48, al menos o más de 49, o al menos o más de 50 aminoácidos de longitud, o al menos o más de 25-50 aminoácidos de longitud, o al menos o más de 30-50 aminoácidos de longitud, o al menos o más de 35-50 aminoácidos de longitud, o al menos o más de 40-50 aminoácidos de longitud, aunque se pueden expresar proteínas más pequeñas, y se pueden expresar proteínas considerablemente más grandes (por ejemplo, cientos de aminoácidos de longitud o incluso miles de aminoácidos de longitud). En un aspecto, se puede expresar una proteína de longitud completa o una proteína que está carente de entre 1 y 20 aminoácidos desde el extremo N y/o C. Las proteínas de fusión y las proteínas quiméricas también son antígenos que se pueden expresar en la invención. Un "antígeno diana" es un antígeno que se dirige específicamente por una composición inmunoterapéutica de la invención (es decir, un antígeno contra el cual se desea la producción de una respuesta inmunitaria). Un "antígeno de cáncer" es un antígeno que comprende al menos un antígeno que está asociado con un cáncer, tal como un antígeno expresado por una célula tumoral, de tal forma que el direccionamiento del antígeno también se dirija al cáncer. Un antígeno de cáncer puede incluir uno o más antígenos de una o más proteínas, incluyendo una o más proteínas asociadas a tumor. Un "antígeno Brachyury" es un antígeno derivado, diseñado o producido a partir de una proteína Brachyury.

Cuando se hace referencia a la estimulación de una respuesta inmunitaria, el término "inmunógeno" es un subconjunto del término "antígeno", y por lo tanto, en algunos casos, se puede usar de manera intercambiable con el término "antígeno". Un inmunógeno, como se usa en la presente memoria, describe un antígeno que produce una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células (es decir, es inmunógena), de tal forma que la administración del inmunógeno a un individuo monta una respuesta inmunitaria específica del antígeno contra los mismos o similares antígenos que se encuentran por el sistema inmunitario del individuo. En una realización, el inmunógeno produce una respuesta inmunitaria mediada por células, incluyendo una respuesta de linfocitos T CD4⁺ (por ejemplo, TH1, TH2 y/o TH17) y/o una respuesta de linfocitos T CD8⁺ (por ejemplo, una respuesta de CTL).

Un "dominio inmunógeno" de un antígeno dado puede ser cualquier porción, fragmento o epítipo de un antígeno (por ejemplo, un fragmento peptídico o subunidad o un epítipo de anticuerpo u otro epítipo conformacional) que contiene al menos un epítipo que puede actuar como un inmunógeno cuando se administra a un animal. Por lo tanto, un dominio inmunógeno es mayor que un aminoácido individual y es al menos de un tamaño suficiente para contener al menos un epítipo que puede actuar como un inmunógeno. Por ejemplo, una proteína individual puede contener múltiples dominios inmunógenos diferentes. Los dominios inmunógenos no necesitan ser secuencias lineales dentro de una proteína, tal como en el caso de una respuesta inmunitaria humoral, donde se contemplan dominios conformacionales.

Un epítipo se define en la presente memoria como un sitio inmunógeno individual dentro de un antígeno dado que es suficiente para producir una respuesta inmunitaria cuando se proporciona al sistema inmunitario en el contexto de señales coestimuladoras apropiadas y/o células activadas del sistema inmunitario. En otras palabras, un epítipo es la parte de un antígeno que se reconoce por los componentes del sistema inmunitario, y también se puede denominar como un determinante antigénico. Los expertos en la técnica reconocerán que los epítopos de linfocitos T son de diferente tamaño y composición de epítopos de linfocitos B o anticuerpo, y que los epítopos presentados a través de la ruta de MHC clase I difieren en el tamaño y en los atributos estructurales de los epítopos presentados a través de la ruta de MHC clase II. Por ejemplo, los epítopos de linfocitos T presentados por las moléculas de MHC clase I tienen típicamente de entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mientras que los epítopos presentados por las moléculas de MHC clase II están menos restringidos en la longitud y pueden ser de hasta 25 aminoácidos o más largos. Además, los epítopos de linfocitos T tienen características estructurales previstas que dependen de las moléculas específicas de MHC unidas por el epítipo. Los epítopos pueden ser epítopos de secuencia lineal o epítopos conformacionales (regiones de unión conservadas). La mayoría de los anticuerpos reconocen epítopos conformacionales.

El Brachyury (que también se puede denominar como "T") es una proteína altamente conservada entre múltiples especies animales diferentes y es un factor de transcripción que contiene un dominio de "caja T" o "dominio T", un motivo de dominio de unión a ADN compartido entre varias proteínas diferentes, denominadas colectivamente la

familia de proteínas de la caja T. El Brachyury humano se clonó por primera vez en 1996 (Edwards *et al.*, anteriormente). Una secuencia nucleotídica que codifica Brachyury humano se representa en la presente memoria por SEQ ID NO:1, que es una secuencia de ARNm que se obtuvo en GENBANK® N.º de acceso NM_003181 (GI:19743811). La SEQ ID NO:1 codifica una proteína Brachyury humana de 435 aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos se representa aquí como SEQ ID NO:2 (también encontrada en GENBANK® N.º de acceso NP_003172; GI:4507339).

Otra proteína Brachyury humana descrita en la presente memoria es una variante de la proteína Brachyury humana representada por la SEQ ID NO:2, y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. La SEQ ID NO:6, también una proteína de 435 aminoácidos, se codifica por una secuencia de nucleótidos representada en la presente memoria por la SEQ ID NO:5. La SEQ ID NO:6 es aproximadamente un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 sobre la longitud completa de la proteína. La SEQ ID NO:6 difiere de la SEQ ID NO:2 en la posición 177 (Asp frente a Gly, respectivamente), la posición 368 (Thr frente a Ser, respectivamente) y la posición 409 (Asn frente a Asp, respectivamente).

Otra proteína Brachyury humana descrita en la presente memoria es un agonista de la proteína Brachyury humana representada por la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:6. Como se usa en general en la presente memoria, un "agonista" es cualquier compuesto o agente, incluyendo, sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, anticuerpos, agentes de unión a ácidos nucleicos, etc., que se unen a un receptor o ligando y produce o activa una respuesta, que puede incluir agentes que imitan o mejoran la acción de una sustancia de origen natural que se une al receptor o ligando. Cuando se usa en el contexto de un antígeno Brachyury de la invención, un antígeno o proteína "agonista" se refiere a un antígeno o proteína que comprende al menos un epítipo agonista de linfocitos T, que también se puede denominar como un "mimotopo". Un péptido de mimotopo es un péptido que imita la estructura de un epítipo tipo silvestre y como un agonista, el mimotopo imita o mejora la acción (función biológica) del epítipo natural. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 (WLLPGTSTL) es un epítipo de linfocitos T de una proteína Brachyury de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (WLLPGTSTV) es un mimotopo o agonista del epítipo de linfocitos T de SEQ ID NO:12.

Un antígeno agonista Brachyury humano se representa aquí por la SEQ ID NO:18. La SEQ ID NO:18 es una proteína de 435 aminoácidos que se codifica por una secuencia de nucleótidos representada en la presente memoria por la SEQ ID NO:17. La SEQ ID NO:18 es idéntica a la SEQ ID NO:6, excepto por una sustitución de una leucina en la posición 254 con respecto a la SEQ ID NO:6 con una valina en la SEQ ID NO:18. Esta sustitución crea un epítipo agonista de linfocitos T en la SEQ ID NO: 18 en las posiciones 246 a 254 que, sin quedar ligado por la teoría, se cree que induce respuestas mejoradas de linfocitos T contra Brachyury en comparación con el epítipo de tipo silvestre (posiciones 246 a 254 de la SEQ ID NO:6).

Las posiciones 41 a 223 de cualquiera de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18 representan el dominio de unión a ADN de la caja T de Brachyury humano, y el dominio de la caja T en otras secuencias de Brachyury, incluyendo secuencias de Brachyury de otras especies, se puede identificar fácilmente por comparación con estas secuencias. Como se usa en la presente memoria, la referencia a un dominio de la caja T de cualquier proteína Brachyury descrita en la presente memoria o conocida en la técnica y utilizada en la invención puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos consecutivos adicionales de la secuencia de Brachyury en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal del dominio de caja T definido (por ejemplo, en cualquier lado de las posiciones 41-223 de las SEQ ID NOs:2, 6 o 18). Brachyury humano, incluyendo las dos proteínas Brachyury humanas descritas en la presente memoria, también contiene diversos epítopos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se han descrito dichos epítopos, por ejemplo, en el documento WO 2008/106551, e incluyen un epítipo de CTL CD8⁺, WLLPGTSTL (también denominado en la presente memoria como Tp2, SEQ ID NO:12), en las posiciones 246 a 254 de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6. Como se ha analizado anteriormente, la SEQ ID NO:18 comprende un epítipo agonista de la SEQ ID NO:12, representado en la presente memoria por la SEQ ID NO:13.

Brachyury humano tiene muy alta homología con Brachyury de otra especie animal y por lo tanto, se pueden utilizar las secuencias de Brachyury de otros organismos en la preparación de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención, particularmente donde estas secuencias son idénticas, sustancialmente homologas, y producen una respuesta inmunitaria eficaz contra el antígeno diana (por ejemplo, Brachyury nativo expresado por una célula tumoral). Por ejemplo, Brachyury murino, que se clonó por primera vez por Hermann y colaboradores en 1990 (Hermann *et al.*, anteriormente) es aproximadamente un 85 % idéntico a Brachyury humano a nivel de nucleótidos, y aproximadamente un 91 % idéntico a nivel de aminoácidos. Con respecto a Brachyury de otros animales, a nivel de aminoácidos, Brachyury humano es un 99,5 % idéntico a Brachyury de *Pan troglodytes*, un 90,1 % idéntico a Brachyury de *Canis lupus familiaris*, un 88,5 % idéntico a Brachyury de *Bos Taurus*, un 92,2 % idéntico a Brachyury de *Rattus norvegicus*, y un 80,9 % idéntico a Brachyury de *Gallus gallus*. Dentro de los aminoácidos 1-223 de Brachyury, que contiene el dominio de caja T, el Brachyury de ratón y de humano difieren en solamente dos aminoácidos (en las posiciones 26 y 96). Una secuencia nucleotídica que codifica Brachyury murino se representa en la presente memoria por SEQ ID NO:3, que es una secuencia de ARNm que se obtuvo en GENBANK® N.º de acceso NM_009309 (GI:118130357). La SEQ ID NO:3 codifica una proteína Brachyury murina de 436 aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos se representa aquí como la SEQ ID NO:4. Las posiciones 41 a 223 de la SEQ ID NO:4 representan el dominio de unión al ADN de caja T de Brachyury murino.

En una realización de la invención, un antígeno Brachyury comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18, o al menos un dominio inmunógeno de las mismas. En una realización, un antígeno Brachyury comprende o consiste en dos, tres, cuatro, cinco o más dominios inmunógenos de Brachyury. En una realización de la invención, un antígeno Brachyury comprende o
 5 consiste en la secuencia de aminoácidos representada por las posiciones de aminoácido 1 o 2 a través de uno de los últimos 25 aminoácidos en el extremo C de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18 (es decir, a través de una cualquiera de las posiciones 441 a 435 de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18, o a través de una cualquiera de las posiciones 442 a 436 de la SEQ ID NO:4). Otro antígeno Brachyury útil en la invención también incluye al menos las posiciones aminoacídicas 1-223 de Brachyury (por ejemplo, las posiciones 1-
 10 223 de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18) o las posiciones 41-223 de Brachyury (por ejemplo, las posiciones 41-223 de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18). Otro antígeno Brachyury útil en la invención incluye desde al menos las posiciones aminoacídicas 1 a 85 hasta entre la posición 255 y el extremo C de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18. Otro antígeno Brachyury útil en la invención incluye desde al menos las posiciones aminoacídicas 1 a 85 hasta entre la posición 430 y el extremo
 15 C de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18. Otro antígeno Brachyury útil en la invención incluye desde al menos las posiciones aminoacídicas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 hasta entre la posición 255 y el extremo C de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18.

Según cualquier caso de la presente invención, la referencia a una proteína de "longitud completa" (o un dominio funcional de longitud completa o dominio inmunológico de longitud completa) incluye la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína o dominio funcional o dominio inmunológico, como se describe en la presente memoria o como se conoce o describe de otro modo en una secuencia públicamente disponible. Una proteína o dominio que es "casi de longitud completa", que también es un tipo de homólogo de una proteína, difiere de una proteína o dominio de longitud completa, por la adición o supresión u omisión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos del extremo N y/o C de tal proteína de longitud completa o dominio de longitud completa. A modo de
 20 ejemplo, varias de las proteínas de fusión descritas en la presente memoria comprenden un antígeno Brachyury de "casi longitud completa" puesto que el antígeno omite la metionina en la posición 1 y sustituye un péptido N-terminal. La referencia general a una proteína o dominio o antígeno puede incluir proteínas tanto de longitud completa como de casi longitud completa, así como otros homólogos de las mismas.

En un aspecto de cualquier realización relacionada con un antígeno Brachyury, un antígeno de cáncer o un antígeno Brachyury es de un tamaño mínimo suficiente para permitir que el antígeno se exprese por la levadura. Para la expresión en levadura, se puede expresar por la levadura una proteína que es típicamente de al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, aunque se pueden expresar por levadura proteínas más pequeñas y proteínas considerablemente más grandes. Por ejemplo, un antígeno Brachyury útil en la invención es un fragmento de una proteína Brachyury que se puede expresar de manera recombinante por levadura y que contiene al menos
 30 un dominio inmunógeno de Brachyury, que puede incluir al menos un dominio inmunógeno de cualquiera de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18. En un aspecto, tal antígeno tiene al menos 25 aminoácidos de longitud, y contiene al menos un dominio inmunógeno de Brachyury. En un aspecto, tal antígeno es mayor de 30 aminoácidos de longitud, y contiene al menos un dominio inmunógeno de Brachyury. En un aspecto, tal antígeno tiene al menos 25-50 aminoácidos de longitud, y contiene al menos un dominio inmunógeno de Brachyury. En un aspecto, tal antígeno tiene al menos 30-50 aminoácidos de longitud, y contiene al menos un dominio inmunógeno de Brachyury. En un aspecto, tal antígeno tiene al menos 35-50 aminoácidos de longitud, y contiene al menos un dominio inmunógeno de Brachyury. En un aspecto, tal antígeno tiene al menos 40-50 aminoácidos de longitud, y contiene al menos un dominio inmunógeno de Brachyury. En un aspecto, tal antígeno tiene al menos 45-50 aminoácidos de longitud, y contiene al menos un dominio inmunógeno de Brachyury. En un caso, el antígeno Brachyury útil en la presente invención tiene al menos 25 aminoácidos de longitud, o al menos: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, o 430 aminoácidos de longitud, que pueden incluir cualquier fragmento de al menos cualquiera de estas longitudes de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:18.
 45 50

En un aspecto, un antígeno Brachyury comprende uno o más epítomos de CTL, que pueden incluir dos o más copias de cualquiera de uno, dos, tres o más de los epítomos de CTL descritos en la presente memoria. En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende uno o más epítomos de linfocitos T CD4⁺. En un aspecto de los linfocitos T, el antígeno Brachyury comprende uno o más epítomos de CTL y uno o más epítomos de linfocitos T CD4⁺. En un aspecto, el epítomo de linfocitos T es un epítomo agonista.
 55

En un aspecto, un antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos de WLLPGTSTL (SEQ ID NO:12, también representada por las posiciones 245 a 254 de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6). En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos de WLLPGTSTV (SEQ ID NO:13, también representada por las posiciones 245 a 254 de SEQ ID NO:18). En un aspecto, el aminoácido en la posición 4 de la SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13 (una prolina o P en estas secuencias) está sustituido por una serina (S), una treonina (T), una isoleucina (I), o una valina (V).
 60

En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos de SQYPSLWSV (SEQ ID NO:14).

En un aspecto, el aminoácido en la posición 2 de SEQ ID NO:14 (una glutamina o Q en esta secuencia) está sustituido por una leucina (L). En un aspecto, el aminoácido en la posición 4 de SEQ ID NO:14 (una prolina o P en esta secuencia) está sustituido por una serina (S), treonina (T), leucina (L), o valina (V). En un aspecto, el aminoácido en la posición 7 de SEQ ID NO:14 (un triptófano o W en esta secuencia) está sustituido por una valina (V), leucina (L), isoleucina (I), serina (S), o treonina (T). En un aspecto, el aminoácido en la posición 9 de SEQ ID NO:14 (una valina o V en esta secuencia) está sustituido por una leucina (L). Se contempla por la invención un antígeno que comprende una secuencia que tiene cualquier combinación de una o más de estas sustituciones en la SEQ ID NO:14.

En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos de RLIASWTPV (SEQ ID NO:15). En un aspecto, el aminoácido en la posición 1 de SEQ ID NO:15 (una arginina o R en esta secuencia) está sustituido por una tirosina (Y) o un triptófano (W). En un aspecto, el aminoácido en la posición 6 de SEQ ID NO:15 (un triptófano o W en esta secuencia) está sustituido por una valina (V), una lisina (L), una isoleucina (I), una serina (S), o una treonina (T). Se contempla por la invención un antígeno que comprende una secuencia que tiene cualquier combinación de una o ambas de estas sustituciones en la SEQ ID NO:15.

En un aspecto, el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos de AMYSFLLDFV (SEQ ID NO:16). En un aspecto, el aminoácido en la posición 2 de SEQ ID NO:16 (una metionina o M en esta secuencia) está sustituido por una leucina (L).

En un caso de la invención, un antígeno Brachyury comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. La proteína de fusión de SEQ ID NO:8 es un polipéptido individual con los siguientes elementos de secuencia fusionados en el marco del extremo N a C: (1) un péptido N-terminal para impartir resistencia a la degradación proteosómica y estabilizar la expresión en levadura (posiciones 1-6 de SEQ ID NO:8); (2) un antígeno Brachyury humano que consiste en las posiciones 2-435 de SEQ ID NO:6 (posiciones 7-440 de SEQ ID NO:8); y (3) una etiqueta de hexahistidina (posiciones 441-446 de SEQ ID NO:8). La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 se codifica por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:7.

En otro caso de la invención, un antígeno Brachyury comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. La proteína de fusión de SEQ ID NO:10 es un polipéptido individual con los siguientes elementos de secuencia fusionados en el marco del extremo N a C: (1) un péptido N-terminal para impartir resistencia a la degradación proteosómica y estabilizar la expresión en levadura (posiciones 1-6 de SEQ ID NO:10); (2) un antígeno Brachyury murino que consiste en las posiciones 2-436 de SEQ ID NO:4 (posiciones 7-441 de SEQ ID NO:10); y (3) una etiqueta de hexahistidina (posiciones 442-447 de SEQ ID NO:10). La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 se codifica por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:9.

En otro caso de la invención, un antígeno Brachyury comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. La proteína de fusión de SEQ ID NO:20 es un polipéptido individual con los siguientes elementos de secuencia fusionados en el marco del extremo N a C: (1) un péptido N-terminal para impartir resistencia a la degradación proteosómica y estabilizar la expresión (posiciones 1 a 6 de SEQ ID NO:20, la secuencia peptídica también se representa en la presente memoria por la SEQ ID NO:11); 2) aminoácidos 2-435 de SEQ ID NO:18 (posiciones 7-440 de SEQ ID NO:20), SEQ ID NO:18 que representan una proteína agonista Brachyury humana de longitud completa; y (3) una etiqueta de hexahistidina (posiciones 441-446 de SEQ ID NO:20). El epítipo agonista (SEQ ID NO:13) se sitúa en las posiciones 251 a 259 de la SEQ ID NO:20 (posiciones 246 a 254 de SEQ ID NO:18). La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 se codifica por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:19.

Un antígeno Brachyury útil en la presente invención también incluye proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las proteínas o antígenos Brachyury descritos en la presente memoria sobre la longitud completa de la proteína, o con respecto a un fragmento definido o dominio del mismo (por ejemplo, un dominio inmunológico o dominio funcional (dominio con al menos una actividad biológica)) que forma parte de la proteína. Por ejemplo, un dominio de la proteína Brachyury descrito en la presente memoria incluye el dominio de la caja T. Un dominio inmunológico se ha descrito en detalle anteriormente.

En algunos aspectos de la invención, se pueden hacer inserciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos para uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más aminoácidos de una proteína Brachyury de tipo silvestre o de referencia, con la condición de que la proteína Brachyury resultante, cuando se use como un antígeno en una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención, produzca una respuesta inmunitaria contra una proteína Brachyury nativa como la proteína Brachyury de tipo silvestre o de referencia, que puede incluir una respuesta inmunitaria mejorada, una respuesta inmunitaria disminuida, o una respuesta inmunitaria sustancialmente similar. Por ejemplo, la invención incluye el uso de antígenos agonistas Brachyury, que pueden incluir uno o más epítopos de linfocitos T que se han mutado para mejorar la respuesta de linfocitos T contra el agonista de Brachyury, tal como al mejorar la afección o afinidad del epítipo por una molécula de MHC o para el receptor de linfocitos T que reconoce el epítipo en el contexto de presentación de MHC. Por lo tanto, los agonistas

de Brachyury pueden mejorar la potencia o eficiencia de una respuesta de linfocitos T contra Brachyury nativo expresado por una célula tumoral. El antígeno Brachyury que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 es un ejemplo no limitante de un agonista de Brachyury (o un antígeno Brachyury que comprende un epítipo agonista).

- 5 Además, las secuencias de expresión N-terminales y las etiquetas C-terminales, tal como las descritas anteriormente con respecto a las proteínas de fusión de SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO:20 son opcionales, pero se pueden seleccionar de varias secuencias diferentes descritas en otra parte en la presente memoria para mejorar o facilitar la expresión, estabilidad, y/o permitir la identificación y/o purificación de la proteína. Además, se conocen en la técnica muchos promotores diferentes adecuados para su uso en levadura. Adicionalmente, pueden introducirse
- 10 secuencias de enlazador de intervención cortas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 péptidos de aminoácidos) entre las porciones de una proteína de fusión que comprenden un antígeno Brachyury por una diversidad de razones, que incluyen la introducción de sitios de enzimas de restricción para facilitar la clonación, como sitios de escisión para proteasas fagosómicas huésped, para acelerar el procesamiento de proteínas o antígenos, y la manipulación futura de las construcciones.
- 15 Opcionalmente, las proteínas, incluyendo las proteínas de fusión, que se usan como un componente de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención se producen usando construcciones de antígeno que son particularmente útiles para mejorar o estabilizar la expresión de antígenos heterólogos en la levadura. En una realización, la proteína o proteínas o el péptido o los péptidos antigénicos deseados se fusionan en su extremo amino-terminal a: (a) un péptido sintético específico que estabiliza la expresión de la proteína de fusión
- 20 en el vehículo de levadura o previene la modificación pos-transduccional de la proteína de fusión expresada (dichos péptidos se describen en detalle, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2004-0156858 A1, publicada el 12 de agosto de 2004); (b) al menos una porción de una proteína de levadura endógena, que incluye pero no se limita a, secuencia guía de factor alfa de levadura, en donde cualquier compañero de fusión proporciona estabilidad mejorada de expresión de la proteína en la levadura y/o impide la modificación post-transduccional de las proteínas por las células de levadura (dichas proteínas también se describen en detalle, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2004-0156858 A1, anteriormente); y/o (c) al menos una porción de una proteína de levadura que hace que la proteína de fusión se exprese en la superficie de la levadura (por ejemplo, una proteína Aga, descrita en más detalle en la presente memoria). Además, la presente invención incluye opcionalmente el uso de péptidos que se fusionan al extremo C de la construcción que codifica el antígeno,
- 25 particularmente para su uso en la selección e identificación de la proteína. Dichos péptidos incluyen, pero no se limitan a, cualquier péptido natural o sintético, tal como una etiqueta peptídica (por ejemplo, 6X His o hexapéptido) o cualquier otra etiqueta de epítipo corta. Se pueden usar péptidos unidos al extremo C de un antígeno según la invención con o sin la adición de los péptidos N-terminales analizados anteriormente, y viceversa.
- 30 En un caso, un péptido sintético útil en una proteína de fusión que se ha de expresar en una levadura se enlaza al extremo N del antígeno, consistiendo el péptido en al menos dos posiciones de aminoácido que son heterólogas al antígeno, en donde el péptido estabiliza las expresiones de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o impide la modificación post-traducciona de la proteína de fusión expresada. El péptido sintético y la porción N-terminal del antígeno forman conjuntamente una proteína de fusión que tiene los siguientes requisitos: (1) el residuo aminoacídico en la posición uno de la proteína de fusión es una metionina (es decir, el primer aminoácido en el péptido sintético es una metionina); (2) el residuo de aminoácido en la posición dos de la proteína de fusión no es una glicina o una prolina (es decir, el segundo aminoácido en el péptido sintético no es una glicina o una prolina); (3) ninguna de las posiciones de aminoácido en las posiciones 2-6 de la proteína de fusión es una metionina (es decir, los aminoácidos en las posiciones 2-6, ya sea la parte del péptido sintético o la proteína, si el péptido sintético es más corto de 6 aminoácidos, no incluyen una metionina); y (4) ninguno de los aminoácidos en las posiciones 2-6 de la proteína de fusión es una lisina o una arginina (es decir, los aminoácidos en las posiciones 2-6, ya sea la parte del péptido sintético o la proteína, si el péptido sintético es más corto de 5 aminoácidos, no incluyen una lisina o una arginina). El péptido sintético puede ser tan corto como dos aminoácidos, pero en un aspecto, es de 2-6 aminoácidos (incluyendo 3, 4, 5 aminoácidos), y puede ser más largo de 6 aminoácidos, en números enteros, hasta a aproximadamente 200 aminoácidos, 300 aminoácidos, 400 aminoácidos, 500 aminoácidos, o más.
- 35 En un caso, una proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de M-X2-X3-X4-X5-X6, en donde M es metionina; en donde X2 es cualquier aminoácido excepto glicina, prolina, lisina o arginina; en donde X3 es cualquiera aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; en donde X4 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; en donde X5 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; y en donde X6 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina. En un caso, el residuo X6 es una prolina. Una secuencia sintética de ejemplo que mejora la estabilidad de expresión de un antígeno en una célula de levadura y/o impide la modificación post-transduccional de la proteína en la levadura incluye la secuencia M-A-D-E-A-P (representada en la presente memoria por SEQ ID NO:11). Además de la estabilidad mejorada del producto de expresión, este compañero de fusión no parece afectar negativamente a la respuesta inmunitaria contra el antígeno inmunizador en la construcción. Además, los péptidos de fusión sintéticos se pueden diseñar para proporcionar un epítipo que se puede reconocer por un agente de selección, tal como un anticuerpo.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

En un aspecto de la invención, el vehículo de levadura se manipula de tal forma que el antígeno se expresa o se proporciona por la distribución o translocación de un producto de proteína expresado, parcialmente o en su

totalidad, sobre la superficie del vehículo de levadura (expresión extracelular). Un método para realizar este aspecto de la invención es usar un brazo separador para colocar una o más proteínas en la superficie del vehículo de levadura. Por ejemplo, se puede usar un brazo separador para crear una proteína de fusión de uno o más antígenos u otra proteína de interés con una proteína que se dirige el uno o más antígenos u otra proteína de interés a la pared celular de levadura. Por ejemplo, tal proteína que se puede usar para dirigir otras proteínas es una proteína de levadura (por ejemplo, la proteína de pared celular 2 (cwp2), la proteína Aga2, Pir4 o Flo1) que permite que el uno o más antígenos u otras proteínas se dirijan a la pared celular de levadura tal que el antígeno u otra proteína está localizada en la superficie de la levadura. Se pueden usar proteínas diferentes de las proteínas de levadura para el brazo separador; sin embargo, para cualquier proteína de brazo separador, es más deseable hacer que la respuesta inmunógena se dirija contra el antígeno diana en lugar de la proteína de brazo separador. Como tal, si se usan otras proteínas para el brazo separador, entonces la proteína de brazo separador que se usa no debe generar esta gran respuesta inmunitaria a la propia proteína de brazo separador de tal forma que la respuesta inmunitaria a los antígenos diana se sobrecargue. Un experto en la técnica debe tener como finalidad una respuesta inmunitaria pequeña a la proteína de brazo separador con relación a la respuesta inmunitaria para el uno o más antígenos diana. Los brazos separadores se pueden construir para tener sitios de escisión (por ejemplo, sitios de escisión de proteasa) que permitan que el antígeno se remueva fácilmente o se procese de la levadura, si se desea. Se puede usar cualquier método conocido para determinar la magnitud de las respuestas inmunitarias (por ejemplo, producción de anticuerpo, ensayos líticos, etc.) y son fácilmente conocidos por un experto en la técnica.

Otro método para colocar el uno o más antígenos u otras proteínas a exponer en la superficie de la levadura es usar secuencias de señal tal como glicosilfosfatidil-inositol (GPI) para anclar la diana a la pared celular de levadura. Como alternativa, se puede lograr la colocación adjuntando secuencias de señal que dirigen el uno o más antígenos u otras proteínas de interés a la ruta secretora mediante translocación en el retículo endoplásmico (ER) de tal forma que el antígeno se une a una proteína que se une a la pared celular (por ejemplo, cwp).

En un aspecto, la proteína de brazo separador es una proteína de levadura. La proteína de levadura puede consistir en entre aproximadamente dos y aproximadamente 800 aminoácidos de una proteína de levadura. En una realización, la proteína de levadura es de aproximadamente 10 a 700 aminoácidos. En otro caso, la proteína de levadura es de aproximadamente 40 a 600 aminoácidos. Otras realizaciones de la invención incluyen la proteína de levadura que es de al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 350 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 450 aminoácidos, al menos 500 aminoácidos, al menos 550 aminoácidos, al menos 600 aminoácidos, o al menos 650 aminoácidos. En un caso, la proteína de levadura es de al menos 450 aminoácidos de longitud. Otra consideración para optimizar la expresión en superficie de antígeno, si se desea, es si la combinación de antígeno y brazo separador se debe expresar como un monómero o como un dímero, o como un trímero, o incluso más unidades conectadas entre sí. Este uso de monómeros, dímeros, trímeros, etc., permite el espaciado o plegado apropiado del antígeno de tal forma que parte, sino todo, el antígeno se presenta en la superficie del vehículo de levadura de una manera que lo haga más inmunógeno.

El uso de proteínas de levadura puede estabilizar la expresión de proteínas de fusión en el vehículo de levadura, impide la modificación post-transduccional de la proteína de fusión expresada y/o dirige la proteína de fusión a un compartimiento particular en la levadura (por ejemplo, que se exprese en la superficie de la célula de levadura). Para la distribución en la ruta secretora de levadura, las proteínas de levadura de ejemplo a usar incluyen, pero no se limitan a: Aga (incluyendo, pero no se limita a, Aga1 y/o Aga2); SUC2 (invertasa de levadura); secuencia líder de señal de factor alfa; CPY; Cwp2p para su ubicación y retención en la pared celular; genes BUD para localización en el brote de células de levadura durante la fase inicial de la formación de células secundarias; Flo1p; Pir2p; y Pir4p.

Se pueden usar otras secuencias para dirigir, retener y/o estabilizar la proteína a otras partes del vehículo de levadura, por ejemplo, en el citosol o la mitocondria o el retículo endoplásmico o el núcleo. Los ejemplos de proteína adecuada de levadura que se pueden usar para cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen, pero no se limitan a, los productos génicos TK, AF, SEC7; fosfoenolpiruvato carboxikinasa PCK1, fosfoglicerocinasa PGK y triosa-fosfato-isomerasa TPI para su expresión reprimible en glucosa y localización citosólica; las proteínas de choque térmico SSA1, SSA3, SSA4, SSC1, cuya expresión se induce y cuyas proteínas son más termoestables tras la exposición de células a tratamiento térmico; la proteína mitocondrial CYC1 para importación en mitocondrias; ACT1.

Los métodos para producir vehículos de levadura y para expresar, combinar y/o asociar vehículos de levadura con antígenos y/o otras proteínas y/o agentes de interés para producir composiciones de inmunoterapia a base de levadura, se contemplan por la invención.

Según la presente invención, la expresión "complejo de vehículo de levadura-antígeno" o "complejo de levadura-antígeno" se usa de manera genérica para describir cualquier asociación de un vehículo de levadura con un antígeno, y se puede usar de manera intercambiable con una "composición de inmunoterapia a base de levadura" cuando dicha composición se usa para producir una respuesta inmunitaria como se ha descrito anteriormente. Dicha asociación incluye la expresión del antígeno por la levadura (una levadura recombinante), introducción de un antígeno en una levadura, unión física del antígeno a la levadura, y mezcla de la levadura y antígeno conjuntamente, tal como en un tampón u otra solución o formulación. Estos tipos de complejos se describen en detalle más adelante.

En un caso, una célula de levadura usada para preparar el vehículo de levadura se transfecta con una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica para una proteína (por ejemplo, el antígeno) de tal forma que la proteína se expresa por la célula de levadura. Tal levadura también se denomina en la presente memoria como una levadura recombinante o un vehículo de levadura recombinante. La célula de levadura entonces se puede formular con un excipiente farmacéuticamente aceptable y administrarse directamente a un paciente, almacenarse para su administración posterior, o cargarse en una célula dendrítica como una célula intacta. La célula de levadura también se puede aniquilar, o se puede derivatizar tal como por formación de esferoplastos, citoplastos, fantasmas o partículas subcelulares de levadura, cualquiera de los cuales puede ir seguido de almacenamiento, administración, o carga del derivado en la célula dendrítica. También se pueden transfectar directamente esferoplastos de levadura con una molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, se produce el esferoplasto a partir de una levadura entera, y luego se transfecta) a fin de producir un esferoplasto recombinante que expresa el antígeno. Las células de levadura o esferoplastos de levadura que expresan de manera recombinante el uno o más antígenos se pueden usar para producir un vehículo de levadura que comprende un citoplasto de levadura, un fantasma de levadura, o una partícula de membrana de levadura o una partícula de pared celular de levadura, o fracción de los mismos.

En general, el vehículo de levadura y el uno o más antígenos y/u otros agentes se pueden asociar por cualquier técnica descrita en la presente memoria. En un aspecto, el vehículo de levadura se cargó de manera intracelular con el uno o más antígenos y/o agentes. En otro aspecto, el uno o más antígenos y/o agentes se unieron covalente o no covalentemente al vehículo de levadura. En aún otro aspecto, el vehículo de levadura y el uno o más antígenos y/o agentes se asociaron por mezcla. En otro aspecto, y en una realización, el uno o más antígenos y/o agentes se expresan de manera recombinante por el vehículo de levadura o por la célula de levadura o esferoplasto de levadura del cual se derivó el vehículo de levadura.

Un número de antígenos y/u otras proteínas que se van a producir por un vehículo de levadura de la presente invención es cualquier número de antígenos y/u otras proteínas que se puede producir razonablemente por un vehículo de levadura, y típicamente varía de al menos uno a al menos aproximadamente 6 o más, incluyendo de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 antígenos y/u otras proteínas.

La expresión de un antígeno u otra proteína en un vehículo de levadura de la presente invención se logra usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En resumen, una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno deseado u otra proteína se inserta en un vector de expresión en una manera tal que la molécula de ácido nucleico se une de manera operativa a una secuencia de control de transcripción a fin de ser capaces de efectuar la expresión constitutiva o regulada de la molécula de ácido nucleico cuando se transforma en una célula huésped de levadura. Las moléculas de ácido nucleico que codifican para uno o más antígenos y/u otras proteínas pueden ser uno o más vectores de expresión unidos operativamente a una o más secuencias de control de expresión. Las secuencias de control de expresión particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tal como secuencias promotoras y de activación aguas arriba. Se puede usar cualquier promotor adecuado de levadura en la presente invención y se conocen una diversidad de dichos promotores por el experto en la técnica. Los promotores para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, pero no se limitan a, promotores de genes que codifican las siguientes proteínas de levadura: alcohol deshidrogenasa I (ADH1) o II (ADH2), CUP1, fosfoglicerato cinasa (PGK), triosa-fosfato-isomerasa (TPI), factor EF-1 alfa de alargamiento translacional (TEF2), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH; también denominada como TDH3, para triosa-fosfato-deshidrogenasa), galactocinasa (GAL1), galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa (GAL7), UDP-galactosa-epimerasa (GAL10), citocromo c1 (CYC1), proteína Sec7 (SEC7) y fosfatasa de ácido (PHO5), incluyendo promotores híbridos tal como los promotores *ADH2/GAPDH* y *CYC1/GAL10*, e incluyendo el promotor *ADH2/GAPDH*, que se induce cuando las concentraciones de glucosa en la célula son bajas (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 por ciento), así como el promotor *CUP1* y el promotor *TEF2*. Asimismo, se conocen varias secuencias de activación aguas arriba (UAS), también denominadas como potenciadores. Las secuencias de activación aguas arriba para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*, incluyen, pero no se limitan a, las UAS de genes que codifican las siguientes proteínas: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 y GAL10, así como otras UAS activadas por el producto génico GAL4, usándose la UAS ADH2 en un aspecto. Puesto que la UAS ADH2 se activa por el producto génico ADR1, puede ser preferible sobreexpresar el gen ADR1 cuando un gen heterólogo se une operativamente a la UAS ADH2. Las secuencias de terminación de transcripción para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen las secuencias de terminación del α -factor, genes GAPDH, y CYC1.

Las secuencias de control de transcripción para expresar genes en levadura metiltrófica incluyen las regiones de control de transcripción de los genes que codifican alcohol oxidasa y formiato deshidrogenasa.

La transfección de una molécula de ácido nucleico en una célula de levadura según la presente invención se puede lograr por cualquier método por el cual se pueda introducir una molécula de ácido nucleico en la célula e incluye, pero no se limita a, difusión, transporte activo, sonicación en baño, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Las moléculas de ácido nucleico transfectadas se pueden integrar en un cromosoma de levadura o mantenerse en vectores extracromosómicos usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de vehículos de levadura que tienen dichas moléculas de ácidos nucleicos se describen en detalle en la presente memoria. Como se analiza anteriormente, también se pueden producir de manera recombinante citoplasto de levadura, fantasma de levadura y partículas de membrana de levadura al transfectar

microorganismos intactos de levadura o esferoplastos de levadura con moléculas deseadas de ácido nucleico, produciendo en los mismos el antígeno, y luego manipulando adicionalmente los microorganismos o esferoplastos usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica para producir extracto de citoplasto, fantasma o membrana subcelular de levadura o fracciones de los mismos que contienen antígenos deseados u otras proteínas.

5 Las condiciones eficaces para la producción de vehículos recombinantes de levadura y la expresión del antígeno y/u otra proteína por un vehículo de levadura incluyen un medio eficaz en el que se pueda cultivar una cepa de levadura. Un medio efectivo es típicamente un medio acuoso que comprende fuentes asimilables de carbohidratos, nitrógeno y fosfato, así como sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas y factores de crecimiento. El medio puede comprender nutrientes complejos o puede ser un medio mínimo definido. Las cepas de
10 levadura de la presente invención se pueden cultivar en una diversidad de recipientes, incluyendo, pero no limitado a, bioreactores, matraces Erlenmeyer, tubos de ensayo, cajas de microtítulo, y cajas de Petri. Se realizó el cultivo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para la cepa de levadura. Dichas condiciones de cultivo están bien dentro de la experiencia de un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Guthrie *et al.* (eds.), 1991, Methods in Enzymology, vol. 194, Academic Press, San Diego). Por ejemplo, bajo un protocolo, se pueden inocular cultivos líquidos que contienen un medio adecuado usando cultivos obtenidos de placas iniciadoras y/o cultivos
15 iniciadores de composiciones de inmunoterapia de levadura-Brachyury, y se cultivan durante aproximadamente 20 h a 30 °C, con agitación a 250 rpm. Después, los cultivos primarios se pueden expandir en cultivos más grandes cuando se desee. La expresión de proteínas de vectores con los cuales se transformó la levadura (por ejemplo, expresión de Brachyury) puede ser constitutiva si el promotor utilizado es un promotor constitutivo, o puede ser inducida por la adición de las condiciones apropiadas de inducción para el promotor si el promotor utilizado es un promotor inducible (por ejemplo, sulfato de cobre en el caso del promotor *CUP1*). En el caso de un promotor inducible, se puede iniciar la inducción de la expresión de proteína después de que el cultivo se ha cultivado a una densidad celular adecuada, que puede ser aproximadamente a 0,2 Y.U./ml o densidades mayores.

Un ejemplo no limitante de un medio adecuado para el cultivo de una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury de la invención es el medio U2. El medio U2 comprende los siguientes componentes: 20 g/l de glucosa, 6,7 g/l de sulfato de amonio que contiene nitrógeno a base de levadura, y 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, leucina, triptófano y adenina. Otro ejemplo no limitante de un medio adecuado para el cultivo de una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury de la invención es el medio UL2. El medio UL2 comprende los siguientes
25 componentes: 20 g/l de glucosa, 6,7 g/l de sulfato de amonio que contiene nitrógeno a base de levadura, y 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, triptófano y adenina.

En un caso de la invención, cuando se usa un promotor inducible (por ejemplo el promotor *CUP1*) para expresar una proteína Brachyury en un vehículo de levadura según la invención, se inicia la inducción de la expresión de proteína a una densidad celular mayor en comparación con la densidad celular que sería adecuada para la mayoría de las proteínas expresadas por levadura usando tal promotor. De manera más específica, los presentes inventores han
35 descubierto que la expresión óptima del antígeno Brachyury impulsada por el promotor *CUP1* se produce cuando la levadura que expresa el antígeno Brachyury se deja cultivar a una densidad celular de entre al menos 0,5 Y.U./ml y aproximadamente 2,0 Y.U./ml, y en un aspecto, a entre 0,5 Y.U./ml y aproximadamente 1,5 Y.U./ml, y en un aspecto, a entre al menos 1,0 Y.U./ml y aproximadamente 2,0 Y.U./ml, y en otro aspecto, a al menos aproximadamente 1,0 Y.U./ml, antes de inducir la expresión del antígeno Brachyury en la levadura. Los presentes inventores han
40 descubierto que posterior a la inducción de la expresión de Brachyury, la levadura se duplicará solo aproximadamente 1X a 1,5X. Además, después de la inducción de la expresión de Brachyury, los inventores han descubierto que el crecimiento de la levadura a densidades celulares mayores de aproximadamente 2,0 Y.U./ml, o más tiempo de aproximadamente 6-8 horas, da como resultado una viabilidad disminuida de los cultivos, mientras que no mejora sustancialmente la acumulación de antígeno en la levadura. Por lo tanto, en una realización de la invención, una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury que tiene expresión de antígeno bajo el control de un promotor inducible, tal como el promotor *CUP1*, se cultiva a fase semilogarítmica antes de inducir la expresión del antígeno. En un aspecto, las células se cultivan a entre aproximadamente 1 y 2 Y.U./ml antes de la inducción de la expresión del antígeno. En un aspecto, se induce la expresión del antígeno (por ejemplo, por la adición de sulfato de cobre) y continúa durante hasta 6, 6,5, 7, 7,5, u 8 horas. En un aspecto, la inducción se produce a una
50 temperatura de aproximadamente 30 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm.

En algunos casos de la invención, la levadura se cultiva bajo condiciones de pH neutro. Como se usa en la presente memoria, el uso en general de la expresión "pH neutro" se refiere a un intervalo de pH entre aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 8, y en un aspecto, entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente 8. Un experto en la técnica apreciará que pueden presentarse fluctuaciones menores (por ejemplo, décimas o centésimas) cuando se
55 mide con un medidor de pH. Como tal, el uso de pH neutro para cultivar células de levadura significa que las células de levadura se cultivan en pH neutro durante la mayoría del tiempo que están en cultivo. En una modalidad, la levadura se cultiva en un medio mantenido a un nivel de pH de al menos 5,5 (es decir, el pH del medio de cultivo no se deja caer por debajo de pH 5,5). En otro aspecto, se cultiva levadura a un nivel de pH mantenido a aproximadamente 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. El uso de un pH neutro al cultivar levadura promueve varios efectos biológicos que son características deseables para usar la levadura como vehículos para inmunomodulación. Por ejemplo, el cultivo de levadura a pH neutro permite un buen crecimiento de la levadura sin efecto negativo en el tiempo de generación celular (por ejemplo, desaceleración de la duplicación de tiempo). La levadura puede continuar creciendo a altas densidades sin perder su flexibilidad de pared celular. El uso de un pH neutro permite la producción de

levadura con paredes celulares flexibles y/o levadura que es más sensible a enzimas de digestión de la pared celular (por ejemplo, glucanasa) a toda las densidades de recolección. Este rasgo es deseable debido a que la levadura con paredes celulares flexibles puede inducir respuestas inmunitarias diferentes o mejoradas en comparación con la levadura cultivada bajo condiciones más ácidas, por ejemplo, al promover la secreción de citocinas por células que presentan antígeno que han fagocitado la levadura (por ejemplo, citocinas tipo TH1 que incluyendo, pero no se limita a, IFN- γ , interleucina-12 (IL-12), e IL-2, así como citocinas pro-inflamatorias tal como IL-6). Además, por estos métodos de cultivo se ofrecen mayor accesibilidad a los antígenos localizados en la pared celular. En otro aspecto, el uso de pH neutro para algunos antígenos permite la liberación del antígeno unido por disulfuro por tratamiento con ditiotreitól (DTT) que no es posible cuando esta célula que expresa el antígeno se cultiva en medio a pH menor (por ejemplo, pH 5).

En un caso, se usa el control de la cantidad de glicosilación de levadura para controlar la expresión de antígenos por la levadura, particularmente en la superficie. La cantidad de glicosilación de levadura puede afectar a la inmunogenicidad y antigenicidad del antígeno, particularmente uno expresado en la superficie, puesto que las porciones de azúcar tienden a ser voluminosas. Como tal, la existencia de porciones de azúcar en la superficie de la levadura y su impacto en el espacio tridimensional alrededor del uno o más antígenos diana se debe considerar en la modulación de levadura según la invención. Se puede usar cualquier método para reducir la cantidad de glicosilación de la levadura (o para aumentarla, si es necesario). Por ejemplo, se puede usar una cepa mutante de levadura que se ha seleccionado para que tenga baja glicosilación (por ejemplo los mutantes *mnn1*, *och1* y *mnn9*), o se puede eliminar por mutación las secuencias aceptadoras de glicosilación en el antígeno diana. Como alternativa, se puede usar levadura con patrones abreviados de glicosilación, por ejemplo *Pichia*. También se puede tratar la levadura usando métodos que reducen o alteran la glicosilación.

En un caso de la presente invención, como una alternativa a la expresión de un antígeno u otra proteína de forma recombinante en el vehículo de levadura, se carga un vehículo de levadura de manera intracelular con la proteína o péptido, o con carbohidratos u otras moléculas que sirven como un antígeno y/o son útiles como agentes inmunomoduladores o modificadores de la respuesta biológica según la invención. Posteriormente, el vehículo de levadura, que ahora contiene el antígeno y/o otras proteínas de manera intracelular, se puede administrar a un individuo o cargar en un portador tal como una célula dendrítica. Los péptidos y proteínas se pueden insertar directamente en los vehículos de levadura de la presente invención por técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tal como por difusión, transporte activo, fusión de liposoma, electroporación, fagocitosis, ciclos de congelación-descongelación y sonicación en baño. Los vehículos de levadura que se pueden cargar directamente con péptidos, proteínas, carbohidratos, u otras moléculas incluyen levadura intacta, así como esferoplastos, fantasmas o citoplastos, que se pueden cargar con antígenos y otros agentes después de la producción. Como alternativa, se puede cargar levadura intacta con el antígeno y/o agente, y luego se pueden preparar a partir de estos los esferoplastos, fantasmas, citoplastos o partículas subcelulares. Se puede cargar cualquier número de antígeno y/u otros agentes en un vehículo de levadura en esta realización, de al menos 1, 2, 3, 4 o cualquier número entero hasta cientos o miles de antígenos y/u otros agentes tal como se proporcionará por la carga de un microorganismo o porciones del mismo, por ejemplo.

En otro caso de la presente invención, un antígeno y/u otro agente se une físicamente al vehículo de levadura. La unión física del antígeno y/u otro agente al vehículo de levadura se puede lograr por cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo métodos de asociación covalente y no covalente que incluyen, pero no se limitan a, reticulación química del antígeno y/u otro agente a la superficie exterior del vehículo de levadura o unión biológicamente del antígeno y/u otro agente a la superficie exterior de vehículo de levadura, tal como usando un anticuerpo u otro compañero de unión. La reticulación química se puede lograr, por ejemplo, por métodos que incluyen enlace de glutaraldehído, marcación por fotoafinidad, tratamiento con carbodiimidas, tratamiento con productos químicos capaces de enlazar enlaces de disulfuro, y tratamiento con otros productos químicos de reticulación normales en la técnica. Como alternativa, se puede poner en contacto un producto químico con el vehículo de levadura que altera la carga de la bicapa lipídica de la membrana de levadura o la composición de la pared celular de manera que sea más probable que la superficie exterior de la levadura se fusione o se una a los antígenos y/u otro agente que tenga características particulares de carga. Los agentes de direccionamiento, tales como anticuerpos, péptidos de unión, receptores solubles, y otros ligandos, también se pueden incorporar en un antígeno como una proteína de fusión o asociarse de otro modo con un antígeno para la unión del anticuerpo al vehículo de levadura.

Cuando el antígeno u otra proteína se expresa en o se une físicamente a la superficie de la levadura, se pueden seleccionar cuidadosamente brazos separadores, en un aspecto, para optimizar la expresión o contenido de antígeno u otra proteína en la superficie. El tamaño de los brazos separadores puede afectar a cuánto del antígeno u otra proteína se expone para unión en la superficie de la levadura. Por lo tanto, dependiendo de qué antígeno o antígenos u otras proteínas se estén usando, un experto en la técnica seleccionará un brazo separador que efectúa un espaciado apropiado para el antígeno u otra proteína en la superficie de levadura. En una realización, el brazo separador es una proteína de levadura de al menos 450 aminoácidos. Se han analizado en detalle anteriormente brazos separadores.

En aún otro caso, el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína se asocian entre sí por un mecanismo de unión más pasivo, no específico o no covalente, tal como mezclando suavemente el vehículo de levadura y el

antígeno u otra proteína conjuntamente en un tampón u otra formulación adecuada (por ejemplo, mezcla).

En un caso, la levadura intacta (con o sin expresión de antígenos heterólogos u otras proteínas) se puede moler o procesar de una manera para producir preparaciones de pared celular de levadura, partículas de membrana de levadura o fragmentos de levadura (es decir, no intacto) y los fragmentos de levadura se pueden proporcionar, en algunas realizaciones, o administrar con otras composiciones que incluyen antígenos (por ejemplo, vacunas de ADN, vacunas de subunidades de proteína, patógenos aniquilados o inactivados, vacunas de vectores víricos) para mejorar las respuestas inmunitarias. Por ejemplo, se puede usar tratamiento enzimático, tratamiento químico o fuerza física (por ejemplo, cizalladura mecánica o sonicación) para romper la levadura en partes que se usan como un adyuvante.

En un caso de la invención, los vehículos de levadura útiles en la invención incluyen vehículos de levadura que se han aniquilado o inactivado. La aniquilación o inactivación de la levadura se puede lograr por cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inactivación térmica de la levadura es una manera estándar de inactivar levadura, y un experto en la técnica puede monitorizar los cambios estructurales del antígeno diana, si se desea, por métodos normales conocidos en la técnica. Como alternativa, se pueden usar otros métodos para inactivar la levadura tales como métodos químicos, eléctricos, radioactivos o UV. Véase, por ejemplo, la metodología descrita en los libros de texto normales de cultivo de levadura, tal como *Methods of Enzymology*, Vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990). Cualquiera de las estrategias de inactivación usada debe tomar en consideración la estructura secundaria, terciaria, o cuaternaria del antígeno diana y conservar dicha estructura para optimizar su inmunogenicidad.

Se pueden formular vehículos de levadura en composiciones de inmunoterapia a base de levadura o productos de la presente invención usando varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los vehículos de levadura se pueden secar por liofilización. También se pueden preparar formulaciones que comprenden vehículos de levadura envasando levadura en una torta o en una tableta, tal como se hace para la levadura usada en operaciones de horneado o fermentación. Además, los vehículos de levadura se pueden mezclar con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón isotónico que se tolera por un huésped o célula huésped. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, y otras soluciones salinas fisiológicamente equilibradas acuosas. También se pueden usar vehículos no acuosos, tal como aceites no volátiles, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contiene agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, glicerol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades menores de aditivos, tal como sustancias que mejoran la isotonicidad y estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones normales pueden ser productos inyectables líquidos o sólidos que se pueden tomar en un líquido adecuado como una suspensión o solución para inyección. Por lo tanto, en una formulación no líquida, el excipiente puede comprender, por ejemplo, dextrosa, albúmina sérica humana y/o conservantes a los que se puede añadir una solución salina o agua estéril antes de la administración.

En un caso de la presente invención, una composición puede incluir agentes adicionales, que también se pueden denominar como compuestos modificadores de la respuesta biológica, o la capacidad de producir estos agentes/modificadores. Por ejemplo, un vehículo de levadura se puede transfectar o cargar con al menos un antígeno y al menos un compuesto modificador de la respuesta biológica/agente, o una composición de la invención se puede administrar junto con al menos un modificador de respuesta biológica/agente. Los modificadores de respuesta biológica incluyen adyuvantes y otros compuestos que pueden modular las inmunorespuestas, que se pueden denominar como compuestos inmunomoduladores, así como compuestos que modifican la actividad biológica de otro compuesto o agente, tal como un producto inmunoterapéutico a base de levadura, no estando limitada dicha actividad biológica a los efectos del sistema inmunitario. Ciertos compuestos inmunomoduladores pueden estimular una respuesta inmunitaria protectora mientras que otras pueden suprimir una respuesta inmunitaria perjudicial, y que un inmunomodulador sea útil junto con un inmunoterapéutico dado a base de levadura puede depender, al menos en parte, de la patología o afección a tratar o prevenir, y/o del individuo que se ha de tratar. Ciertos modificadores de la respuesta biológica mejoran preferiblemente la respuesta inmunitaria mediada por células mientras que otros mejoran preferiblemente una respuesta inmunitaria humoral (es decir, pueden estimular una respuesta inmunitaria en la que exista un nivel aumentado de inmunidad mediada por células en comparación con la inmunidad humoral, o viceversa). Ciertos modificadores de la respuesta biológica tienen una o más propiedades en común con las propiedades biológicas de los productos inmunoterapéuticos a base de levadura o mejoran o complementan las propiedades biológicas de los productos inmunoterapéuticos a base de levadura. Existen técnicas conocidas por los expertos en la técnica para medir la estimulación o supresión de respuestas inmunitarias, así como para diferenciar las respuestas inmunitarias mediadas por células de las respuestas inmunitarias humorales, y para diferenciar un tipo de respuesta mediadas por células de otra (por ejemplo, una respuesta TH17 frente a una respuesta TH1).

Los agentes/modificadores de la respuesta biológica útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas, hormonas, derivados lipídicos, péptidos, proteínas, polisacáridos, fármacos de molécula pequeña, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (incluyendo, pero no se limitan a, anticuerpos anti-citocina, anticuerpos anti-receptores de citocina, anticuerpos anti-quimiocinas), vitaminas, polinucleótidos,

porciones de unión a ácido nucleico, aptámeros y moduladores del crecimiento. Algunos agentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, IL-1 o agonistas de IL-1 o de IL-1R, anti-IL-1 u otros antagonistas de IL-1; IL-6 o agonistas de IL-6 o de IL-6R, anti-IL-6 u otros antagonistas de IL-6; IL-12 o agonistas de IL-12 o de IL-12R, anti-IL-12 u otros antagonistas de IL-12; IL-17 o agonistas de IL-17 o de IL-17R, anti-IL-17 u otros antagonistas de IL-17; IL-21 o agonistas de IL-21 o de IL-21R, anti-IL-21 u otros antagonistas de IL-21; IL-22 o agonistas de IL-22 o de IL-22R, anti-IL-22 u otros antagonistas de IL-22; IL-23 o agonistas de IL-23 o de IL-23R, anti-IL-23 u otros antagonistas de IL-23; IL-25 o agonistas de IL-25 o de IL-25R, anti-IL-25 u otros antagonistas de IL-25; IL-27 o agonistas de IL-27 o de IL-27R, anti-IL-27 u otros antagonistas de IL-27; interferón de tipo I (incluyendo IFN- α) o agonistas o antagonistas de interferón de tipo I o un receptor de los mismos; interferón de tipo II (incluyendo IFN- γ) o agonistas o antagonistas de interferón de tipo II o un receptor de los mismos; anti-CD40, CD40L, proteína del gen 3 de activación de linfocitos (LAG3) y/o IMP321 (factor inmunoestimulador de linfocitos T derivado de la forma soluble de LAG3), anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, para liberar linfocitos T anérgicos); co-estimuladores de linfocitos T (por ejemplo, anti-CD137, anti-CD28, anti-CD40); alemtuzumab (por ejemplo, Campath®), denileucina diftitox (por ejemplo, ONTAK®); anti-CD4; anti-CD25; anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2; agentes que bloquean FOXP3 (por ejemplo, para anular la actividad/eliminar los linfocitos T reguladores CD4+/CD25+); ligando Flt3, imiquimod (Aldara™), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), sargramostim (Leukine®); hormonas, incluyendo, sin limitación, prolactina y hormona del crecimiento; agonistas del receptor tipo Toll (TLR), incluyendo, pero sin limitación, agonistas TLR-2, agonistas TLR-4, agonistas TLR-7, y agonistas TLR-9; antagonistas TLR, incluyendo, pero sin limitación, antagonistas TLR-2, antagonistas TLR-4, antagonistas TLR-7 y antagonistas TLR-9; agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores, incluyendo, pero sin limitación, inhibidores de COX-2 (por ejemplo, Celecoxib, AINE), glucocorticoides, estatinas, y talidomida y análogos de los mismos, incluyendo IMiD™ (que son análogos estructurales y funcionales de talidomida (por ejemplo, REVLIMID® (lenalidomida), ACTIMID® (pomalidomida)); agentes proinflamatorio, tales como componentes fúngicos o bacterianos o cualquier citocina o quimiocina proinflamatoria; vacunas inmunoterapéuticas, incluyendo, pero sin limitación, vacunas basadas en virus, vacunas basadas en bacterias, o vacunas basadas en anticuerpos; y cualquier otro inmunomodulador, inmunopotenciador, agente antiinflamatorio, agente proinflamatorio, y cualquier agente que module el número de, module el estado de activación de, y/o module la supervivencia de las células que presentan antígeno o de las células TH17, TH1, y/o Treg. Cualquier combinación de dichos agentes se contempla por la invención, y cualquiera de dichos agentes combinado con o administrado en un protocolo con (por ejemplo, concurrentemente, secuencialmente, o en otros formatos con) un producto inmunoterapéutico a base de levadura es una composición incluida por la invención. Dichos agentes se conocen bien en la técnica. Estos agentes se pueden usar en solitario o en combinación con otros agentes descritos en la presente memoria.

Los agentes pueden incluir agonistas y antagonistas de una proteína o péptido determinado o dominio de los mismos. Como se usa en la presente memoria, un "agonista" es cualquier compuesto o agente, incluyendo, sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, anticuerpos, agentes de unión a ácidos nucleicos, etc., que se unen a un receptor o ligando y produce o activa una respuesta, que puede incluir agentes que imitan o mejoran la acción de una sustancia de origen natural que se une al receptor o ligando. Un "antagonista" es cualquier compuesto o agente, incluyendo sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, anticuerpos, agentes de unión a ácido nucleico, etc., que bloquea o inhibe o reduce la acción de un agonista.

Las composiciones de la invención pueden incluir adicionalmente o se pueden administrar con (concurrentemente, secuencialmente, o de manera intermitente con) cualquier otro agente o composiciones o protocolos que son útiles para prevenir o tratar cáncer o cualquier compuesto que trate o mejore cualquier síntoma de cáncer, y particularmente cánceres asociados con expresión o sobreexpresión de Brachyury. Además, las composiciones de la invención se pueden usar conjuntamente con otras composiciones inmunoterapéuticas, incluyendo inmunoterapia profiláctica y/o terapéutica. De hecho, las composiciones de la invención se pueden usar para inhibir o reducir resistencia a quimioterapia o resistencia a radiación que puede presentarse en cáncer metastático inhibiendo la expresión de Brachyury en el cáncer (e inhibiendo este modo las influencias anti-proliferativas) o composiciones de la invención pueden mejorar el rendimiento de quimioterapia o terapia de radiación en un individuo. Los agentes, composiciones o protocolos adicionales (por ejemplo, protocolos terapéuticos) que son útiles para el tratamiento de cáncer incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, resección quirúrgica de un tumor, terapia de radiación, trasplante de células madre alogénicas o autólogas, y/o terapias dirigidas contra el cáncer (por ejemplo, fármacos de molécula pequeña, productos biológicos, o terapias de anticuerpos monoclonales que se dirigen específicamente a moléculas implicadas en el crecimiento y avance tumoral, incluyendo pero no limitado a, moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERM), inhibidores de aromatasa, inhibidores de tirosina cinasa inhibidores de serina/treonina cinasa, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), activadores del receptor de retinoide, estimuladores de apoptosis, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), o inmunoestimuladores). Cualquiera de estos agentes terapéuticos adicionales y/o protocolos terapéuticos se pueden administrar antes, concurrentemente con, alternando con, o después de las composiciones de inmunoterapia de la invención o en diferentes puntos de tiempo. Por ejemplo, cuando se da a un individuo junto con quimioterapia o una terapia dirigida contra el cáncer, puede ser deseable administrar las composiciones de inmunoterapia de levadura-Brachyury durante el "día libre" entre las dosis de quimioterapia o terapia dirigida contra el cáncer, a fin de maximizar la eficiencia de las composiciones de inmunoterapia. La resección quirúrgica de un tumor puede preceder frecuentemente a la administración de una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury, pero puede producirse cirugía adicional o primaria durante o después de la administración de una composición de inmunoterapia

de levadura-Brachyury.

La invención también incluye un kit que comprende cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria, o cualquiera de los componentes individuales de la composición descrita en la presente memoria. Los kits pueden incluir reactivos adicionales e instrucciones escritas para usar cualquiera de las composiciones de la invención para prevenir o tratar cáncer asociado con expresión o sobreexpresión de Brachyury.

Métodos para administración o uso de composiciones de la invención

Las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury de la invención se diseñan para su uso para prevenir o tratar cánceres que están asociados con o caracterizados por expresión o sobreexpresión de Brachyury, incluyendo mediante la prevención de la aparición de estos cánceres, detención del avance de dichos cánceres o eliminación de dichos cánceres. Más particularmente, las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury se pueden usar para prevenir, inhibir, o retrasar el desarrollo de tumores que expresan Brachyury y/o para prevenir, inhibir o retrasar la migración tumoral y/o invasión tumoral de otros tejidos (metástasis) y/o para prevenir o inhibir en general el avance del cáncer en un individuo. Las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury también se pueden usar para mejorar al menos un síntoma del cáncer, tal como reducir la carga tumoral en el individuo; inhibir el crecimiento tumoral en el individuo; incrementar la supervivencia del individuo; prevenir, inhibir, invertir o retrasar el desarrollo de la migración tumoral y/o invasión tumoral de otros tejidos (cáncer metastático) y/o prevenir, inhibir, invertir o retrasar el avance del cáncer en el individuo. La inmunoterapia de levadura-Brachyury también puede usarse para inhibir, reducir o eliminar la resistencia a quimioterapia o resistencia a radiación que puede presentarse en cáncer metastático al inhibir la expresión de Brachyury en el cáncer, y las composiciones de la invención para mejorar el rendimiento de la quimioterapia o terapia de radiación en un individuo.

Los cánceres que son relevantes para las composiciones y métodos de la invención son cualquier cáncer que exprese, o pueda expresar, Brachyury, o cánceres en proximidad a cánceres que expresan o pueden expresar Brachyury, e incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, ovario, testículos, pulmón, colon, páncreas, o próstata, e incluyen cánceres metastáticos y de fase tardía. Además, Brachyury se expresa en tumores con origen en linfocitos T, tal como leucemia linfocítica crónica (CLL), linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr, linfomas de Burkitt y de Hodgkin, así como cánceres metastáticos de los mismos.

Un caso de la invención se refiere un método para inhibir la migración tumoral y/o para reducir, detener (parar), invertir o prevenir el avance metastático de cáncer en un individuo que tiene cáncer, o para invertir el desarrollo de eventos metastáticos en un cáncer. Como se ha analizado anteriormente, Brachyury promueve la transición epitelial-mesénquimal (EMT) en células tumorales humanas, confiriendo a las células tumorales un fenotipo mesénquimal, así como capacidades migratorias e invasivas, mientras que atenúa el avance del ciclo de las células tumorales. Por lo tanto, la implicación de Brachyury en los procesos metastáticos lo hace una diana ideal para la prevención o inhibición de procesos metastáticos, incluyendo detección de cáncer en una fase premetastática. El uso de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención puede ser eficaz para prevenir o tratar cáncer metastático, incluyendo detención del progreso del cáncer, haciendo frente al escape (o escape intentando) del cáncer de la terapia tradicional, tal como quimioterapia y radiación. El método incluye las etapas de administrar al individuo que tiene cáncer una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención como se describe en la presente memoria, que incluye, pero no se limita a: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury.

En un aspecto, no se detecta Brachyury en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición. En general, cuando no se detecta Brachyury en el cáncer del individuo, el individuo puede tener un cáncer de fase temprana en el que aún no se ha manifestado la expresión de Brachyury (por ejemplo, estadio I o estadio II), o en el cual aún no es detectable la expresión de Brachyury en ningún evento (es decir, Brachyury se puede o no expresar a un bajo nivel o en un pequeño número de células tumorales, pero aún no es fácilmente detectable usando los métodos normales de detección). En este aspecto de la invención, se previene, retrasa o inhibe el desarrollo de células tumorales que expresan Brachyury mediante el uso de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury. Como resultado, se previene, retrasa o inhibe la migración tumoral y/u otros procesos metastáticos que conducen al avance metastático del tumor, y/o se produce la detección general del avance tumoral en el individuo.

En otro aspecto, la expresión de Brachyury se detecta o puede detectarse en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición. El individuo puede tener cáncer de estadio I, de estadio II, de estadio III o de estadio IV en este aspecto de la invención. En este aspecto, el uso de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury reduce, elimina o desacelera o detiene el crecimiento de tumores que expresan Brachyury, que puede dar como resultado la reducción de la carga tumoral en el individuo, la inhibición del crecimiento tumoral que expresa Brachyury, y/o un aumento de la supervivencia del individuo. El individuo puede experimentar una detección, desaceleración o inversión de los procesos metastáticos, mejorando la supervivencia y salud del paciente, y adicionalmente, permitiendo otros protocolos terapéuticos para tratar el cáncer.

De hecho, el cáncer metastático se puede asociar con resistencia, o resistencia aumentada, a terapias de cáncer tal como quimioterapia, radiación, o terapia dirigida contra el cáncer, por lo que el cáncer "escapa" de la terapia o

simplemente se ve menos afecto por la terapia y avanza. Por consiguiente, existe la necesidad de reducir o eliminar la resistencia a dichas terapias para mejorar o potenciar la eficiencia de la terapia y mejorar la salud y supervivencia del paciente. Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un método para reducir o prevenir la resistencia a quimioterapia, resistencia a terapia dirigida contra el cáncer o resistencia a radiación en un paciente con cáncer. El método comprende administrar a un individuo que tiene cáncer y está recibiendo quimioterapia y/o terapia de radiación para el cáncer, una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury como se describe en la presente memoria, que puede incluir una composición que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury. Este método de la invención también se puede usar para tratar la resistencia asociada con otros tratamientos terapéuticos para cáncer, incluyendo, pero no limitado a, terapia dirigida contra el cáncer.

En un aspecto de este caso, no se detecta Brachyury en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición. En este aspecto, la administración de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury impide o inhibe el comienzo de la resistencia a quimioterapia o terapia de radiación al inhibir el desarrollo de células tumorales que expresan Brachyury en el cáncer. En otro aspecto, se detecta expresión de Brachyury en el cáncer del individuo en el momento en que se administra en primer lugar la composición. En este aspecto, el individuo puede o no estar experimentando ya resistencia a la quimioterapia o la radiación. En cualquier caso, la administración de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención impide o inhibe la resistencia a quimioterapia o terapia de radiación o mejora la capacidad de la quimioterapia o terapia de radiación para tratar el individuo, al reducir o eliminar células tumorales que expresan Brachyury en el paciente.

Otro caso de la invención se refiere a un método para tratar cáncer, y particularmente, un cáncer que expresa Brachyury. El método incluye administrar a un individuo que tiene un cáncer que expresa Brachyury, una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury descrita en la presente memoria, que puede incluir una composición que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury. En un aspecto, el método reduce la carga tumoral en el paciente. En un aspecto, el método aumenta la supervivencia del paciente. En un aspecto, el método inhibe el crecimiento tumoral en el individuo. En un aspecto, el método previene, detiene o invierte el avance metastático del tumor.

Puesto que se cree que la expresión de Brachyury es más prevalente a medida que avanza o progresa un cáncer a estadios superiores (por ejemplo, del estadio I al estadio II al estadio III al estadio IV, dependiendo del cáncer particular) y se asocia con procesos metastáticos, es una realización de la invención proporcionar un método para prevenir o retrasar la aparición de un cáncer que expresa Brachyury, o para detener el cáncer en una fase premetastásica o preneoplásica. Tal método incluye administrar a un individuo en el que no se detectan células de cáncer que expresan Brachyury, una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury descrita en la presente memoria, que puede incluir una composición que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury. En un aspecto de esta realización, se sabe que el cáncer expresa o se cree que es susceptible a la expresión de Brachyury en alguna fase del cáncer en al menos un subconjunto de individuos con el cáncer. En un aspecto de este caso, el individuo tiene ya un cáncer, pero no se detecta Brachyury en el cáncer en el momento en que se administra en primer lugar la composición, lo que significa que el individuo puede tener un cáncer de estadio más temprano en el cual aún no se ha manifestado la expresión de Brachyury, o en el que aún no es detectable la expresión de Brachyury en ningún evento (es decir, se puede expresar o no Brachyury a un bajo nivel o en un pequeño número de células tumorales, pero aún no es fácilmente detectable usando métodos de detección convencionales). En algunos casos, el tipo de cáncer se puede conocer como que tiene una alta proporción de progreso metastático. En este aspecto, la administración de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury previene, retrasa o inhibe el desarrollo de células tumorales que expresan Brachyury en el cáncer del paciente, y por lo tanto previene, detiene, retrasa o inhibe los procesos metastáticos que acompañan la expresión de Brachyury. En otro aspecto, el individuo no tiene cáncer cuando se administra la composición. Tal individuo puede estar "predispuesto" o igualmente desarrollar cáncer, quizá debido a antecedentes familiares o un marcador genético, o debido a que el individuo ha mostrado signos de células o lesiones precancerosas o tiene células o lesiones precancerosas (preneoplásicas).

En un aspecto, el individuo se trata adicionalmente con al menos otro compuesto terapéutico o protocolo terapéutico útil para el tratamiento de cáncer. Dichos agentes terapéuticos y protocolos se han analizado en detalle en otra parte en la presente memoria. Por ejemplo, en cualquiera de las realizaciones con respecto a los métodos de la invención descritos en la presente memoria, en un aspecto, cuando el individuo tiene cáncer (a pesar del estado de expresión detectable de Brachyury en células tumorales), el individuo se está tratando o se ha tratado con otra terapia para cáncer. Dicha terapia puede incluir cualquiera de los protocolos terapéuticos o uso de cualquier compuesto terapéutico o agente descrito previamente en la presente memoria, incluyendo, pero no limitado a, quimioterapia, terapia de radiación, terapia dirigida contra el cáncer, resección quirúrgica de un tumor, transferencia de células madre, terapia con citocinas, transferencia adoptiva de linfocitos T, y/o administración de una segunda composición inmunoterapéutica. En el caso de la administración de una segunda composición inmunoterapéutica, dichas composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, inmunoterapia adicional a base de levadura, inmunoterapia a base de virus recombinantes (vectores víricos), terapia con citocinas, terapia inmunoestimuladora (incluyendo quimioterapia con propiedades inmunoestimuladoras), vacunas de ADN y otras composiciones de inmunoterapia.

En un aspecto, la segunda composición inmunoterapéutica incluye un segundo antígeno de cáncer que no incluye el

antígeno Brachyury. Por ejemplo, una segunda composición inmunoterapéutica útil junto con una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury es una composición inmunoterapéutica de levadura que comprende otro antígeno de cáncer. Dichos antígenos de cáncer pueden incluir, pero no se limitan a, antígeno carcinoembrionario (CEA), oncoproteína Ras mutada puntual, MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 mutadas normales y puntuales, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, poliposis adenomatosa del colon (APC), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógeno (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina, NGEP, modificaciones de dichos antígenos, variantes de corte y empalme de dichos antígenos, y agonistas de epítipo de dichos antígeno, así como combinaciones de dichos antígenos y/o dominios inmunógenos de los mismos, modificaciones de los mismos, variantes de los mismos, y/o agonistas de epítopos de los mismos.

Como se usa en la presente memoria, "tratar" un cáncer, o cualquier permutación del mismo (por ejemplo, "tratado para cáncer", etc.) se refiere en general a administrar una composición de la invención una vez que se ha presentado el cáncer (por ejemplo, una vez que se ha diagnosticado el cáncer o se ha detectado en un individuo), con al menos un objetivo terapéutico del tratamiento (en comparación con la ausencia de este tratamiento) que incluye: reducción en la carga tumoral, inhibición del crecimiento tumoral, aumento de la supervivencia del individuo, retraso, inhibición, detección o prevención de la aparición o desarrollo del cáncer metastático (tal como al retrasar, inhibir, detener o prevenir la aparición de desarrollo de migración tumoral y/o invasión tumoral de tejidos fuera de cáncer primario y/o otros procesos asociados con progreso metastático de cáncer), retraso o detención del progreso del cáncer, mejora de las respuestas inmunitarias contra el tumor, mejora de las respuestas inmunitarias de memoria a largo plazo contra los antígenos tumorales, y/o salud general mejorada del individuo. "Prevenir" o "proteger" de un cáncer, o cualquier permutación de los mismos (por ejemplo, "prevención de cáncer", etc.), se refiere en general a administrar una composición de la invención antes de que se haya presentado un cáncer, o antes de que se haya presentado una fase específica del cáncer o expresión de antígeno tumoral en un cáncer (por ejemplo, antes de que se detecte en el cáncer la expresión de Brachyury), con al menos un objetivo del tratamiento (en comparación con la ausencia de este tratamiento) que incluye: prevenir o retrasar la aparición o desarrollo de un cáncer, o si el cáncer se presenta después del tratamiento, al menos reducir la gravedad del cáncer (por ejemplo, reducir el nivel de crecimiento tumoral, detener el progreso de cáncer, mejorar la respuesta inmunitaria contra el cáncer, inhibir los procesos metastáticos) o mejorar los resultados en el individuo (por ejemplo, mejorarla supervivencia).

La presente invención incluye el suministro (administración, inmunización) de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención a un sujeto o individuo. El proceso de administración se puede realizar *ex vivo* o *in vivo*, pero típicamente se realiza *in vivo*. La administración *ex vivo* se refiere a realizar parte de la etapa reguladora fuera del paciente, tal como administrar una composición de la presente invención a una población de células (células dendríticas) extraídas de un paciente bajo condiciones de tal forma que un vehículo de levadura, uno o más antígenos y cualquier otro agente o composición se carguen en la célula, y devolver las células al paciente. La composición terapéutica de la presente invención se puede devolver a un paciente, o administrarse a un paciente, por cualquier modo adecuado de administración.

La administración de una composición puede ser sistémica, en mucosa y/o próxima a la ubicación del sitio diana (por ejemplo, cerca de un sitio de un tumor). Las rutas adecuadas de administración serán evidentes para los expertos en la técnica, dependiendo del tipo de cáncer que se ha de prevenir o tratar y/o la población de células objetivo o tejido diana. Diversos métodos aceptables de administración incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intranodal, administración intracoronaria, administración intraarterial (por ejemplo, en una arteria carótida), administración subcutánea, administración transdérmica, administración intratraqueal, administración intraarticular, administración intraventricular, inhalación (por ejemplo, aerosol), intracraneal, intraespinal, intraocular, aural, intranasal, oral, pulmonar, impregnación de un catéter, e inyección directa en un tejido. En un aspecto, las rutas de administración incluyen: intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intranodal, intramuscular, transdérmica, inhalada, intranasal, oral, intraocular, intraarticular, intracraneal, e intraespinal. La administración parenteral puede incluir intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutánea, rutas de catéter atrial y de catéter venal. La administración oral puede incluir gotas para los oídos, la administración intranasal puede incluir gotas para la nariz o inyección intranasal, y la administración intraocular puede incluir gotas oculares. La administración por aerosol (inhalación) también se puede realizar usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189: 11277-11281, 1992). En un aspecto, una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención se administra por vía subcutánea. En un aspecto, la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury se administra directamente en un medio tumoral.

En general, una dosis adecuada individual de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury es una dosis que es capaz de proporcionar de manera eficaz un vehículo de levadura y el antígeno Brachyury a un tipo celular determinado, tejido, o región del cuerpo del paciente en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria específica del antígeno contra uno o más antígenos Brachyury o epítopos, cuando se administra una o más veces durante un período adecuado de tiempo. Por ejemplo, en un caso, una dosis individual de una levadura-Brachyury de la presente invención es de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^7 equivalentes de células de levadura por kilogramo de peso corporal del organismo al que se administra la composición. En un aspecto, una dosis individual de un vehículo de levadura de la presente invención es de aproximadamente 0,1

unidades de levadura (Y.U., que es 1×10^6 células de levadura o equivalentes de células de levadura) a aproximadamente 100 Y.U. (1×10^9 células) por dosis (es decir, por organismo), incluyendo cualquier dosis interina, en aumentos de $0,1 \times 10^6$ células (es decir, $1,1 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$, $1,3 \times 10^6$...). En una realización, una dosis adecuada incluye dosis entre 1 Y.U. y 40 Y.U. y en un aspecto, entre 10 Y.U. y 40 Y.U. En una realización, las dosis se administran en diferentes sitios en un individuo pero durante el mismo período de dosificación. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de 40 Y.U. inyectando dosis de 10 Y.U. a cuatro sitios diferentes en el individuo durante un período de dosificación. La invención incluye la administración de una cantidad de la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 Y.U. o más) en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más sitios diferentes en un individuo para formar una dosis individual. Una unidad de levadura (Y.U.) es 1×10^7 células de levadura o equivalentes de células de levadura.

Por ejemplo, se administran "refuerzos" de una composición terapéutica, cuando la respuesta inmunitaria contra el antígeno ha disminuido o a medida que se necesite para proporcionar una respuesta inmunitaria o inducir una respuesta de memoria contra un antígeno o antígenos particulares. Se pueden administrar refuerzos aproximadamente con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 semanas de separación o mensualmente, cada dos meses, cada cuatro meses, anualmente y/o en pocos o varios aumentos anuales después de la administración original, dependiendo del estado del individuo que se trate y del objetivo de la terapia en el momento de la administración (por ejemplo, profiláctica, tratamiento activo, mantenimiento). En un caso, un programa de administración es uno en el que se administran dosis de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces durante un período de tiempo de semanas, a meses, a años. En una modalidad, las dosis se administran semanalmente o cada dos semanas para una 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis, seguido de dosis cada dos semanas o mensuales según sea necesario para lograr el tratamiento terapéutico o preventivo deseado para cáncer. También se pueden dar refuerzos adicionales a intervalos similares o más prolongados (meses o años) como una terapia de mantenimiento o de remisión, si se desea.

En un aspecto de la invención, se administran uno o más agentes terapéuticos adicionales o protocolos terapéuticos o se realizan de manera secuencial y/o concurrentemente con la administración de la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury (por ejemplo, resección quirúrgica del tumor, administración de la quimioterapia, administración de la terapia de radiación, administración de otras composiciones o protocolos de inmunoterapia, terapia con citocinas, transferencia adoptiva de linfocitos T, o trasplante de células madre). Por ejemplo, se pueden administrar o realizar una o más terapias antes de que se administre la primera dosis de la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury o después de la administración de la primera dosis. En una realización, se pueden administrar una o más terapias o realizar de una manera alterna con la dosis de la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury, tal como en un protocolo en el que se administra la composición de levadura-Brachyury a intervalos preestablecidos entre una o más dosis consecutivas de la quimioterapia u otra terapia. En una realización, la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury se administra en una o más dosis durante un período de tiempo antes de comenzar las terapias adicionales. En otras palabras, la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury se administra como una monoterapia durante un período de tiempo, y luego se añade una terapia adicional (por ejemplo, quimioterapia), concurrentemente con nuevas dosis de inmunoterapia de levadura-Brachyury, o de una manera alterna con la inmunoterapia de levadura-Brachyury. Como alternativa o adicionalmente, se pueden administrar otras terapias durante un período de tiempo antes de que empiece la administración de la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury, y se pueden combinar los conceptos (por ejemplo, resección quirúrgica de un tumor, seguido de monoterapia con inmunoterapia de levadura-Brachyury durante varias semanas, seguido de dosis alternas de quimioterapia e inmunoterapia de levadura-Brachyury durante semanas o meses, opcionalmente seguido de monoterapia usando inmunoterapia de levadura-Brachyury u otra terapia, o por un nuevo protocolo de combinaciones de terapia proporcionada secuencialmente, concurrentemente, o de una manera alterna). Se contemplan diversos protocolos para el tratamiento de cáncer usando inmunoterapia de levadura-Brachyury por la invención, y estos ejemplos se deben considerar como ejemplos no limitantes de diversos protocolos posibles.

En un aspecto de la invención, los antígenos adicionales diferentes de Brachyury también se seleccionan como diana usando inmunoterapia a base de levadura, además de seleccionar como diana Brachyury. Dichos antígenos diana adicionales se pueden incluir dentro del mismo vehículo de levadura que los antígenos Brachyury, o se pueden producir composiciones adicionales de inmunoterapia a base de levadura que se dirijan a diferentes antígenos, y luego se combinan como se desee dependiendo del individuo a tratar, los antígenos expresados por el tipo de cáncer o por el tumor particular individual, y/o dependiendo de la fase de cáncer en el individuo, o la fase de tratamiento del individuo. Por ejemplo, se puede seleccionar una combinación de antígenos que incluye: (1) antígenos comprendidos en eventos seminales en el desarrollo de cáncer, tal como Ras mutado, antígenos comprendidos en o asociados con la desregulación de procesos celulares, tal como CEA, y (3) Brachyury, que está implicado en procesos metastáticos. Por ejemplo, una o más composiciones de inmunoterapia a base de levadura pueden expresar uno o más antígenos, incluyendo, pero no se limitan a, antígeno carcinoembrionario (CEA), oncoproteína Ras mutada puntual, MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 mutadas normales y puntuales, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, poliposis adenomatosa del colon (APC), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógeno (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkh, ews-flt-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina, NGEP, modificaciones de dichos antígenos, variantes

de corte y empalme de dichos antígenos, y agonistas de epítipo de dichos antígeno, así como combinaciones de dichos antígenos y/o dominios inmunógenos de los mismos, modificaciones de los mismos, variantes de los mismos, y/o agonistas de epítopos de los mismos. Se puede administrar una, dos, tres o más de estas composiciones de inmunoterapia a base de levadura a un individuo antes de, concurrentemente con, o de manera alterna con, y/o después de la administración de una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury, a fin de optimizar el direccionamiento de antígenos en el tumor del individuo. Como anteriormente, también se pueden usar terapias adicionales en dichos protocolos (por ejemplo, resección quirúrgica de tumor, quimioterapia, terapia dirigida contra el cáncer, terapia de radiación, etc.).

En una realización de la invención, se proporciona un método para tratar cáncer. El método incluye las etapas de: (a) administrar a un individuo que tiene cáncer en el que no se ha detectado la expresión de Brachyury, una primera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un primer antígeno de cáncer que no comprende un antígeno Brachyury; y (b) administrar al individuo, antes de, concurrentemente con, o posterior a, la administración de la primera composición inmunoterapéutica, una segunda composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un segundo antígeno de cáncer que comprende un antígeno Brachyury. En casos adicionales, el método puede incluir administrar una o más composiciones inmunoterapéuticas adicionales, en donde cada una de la una o más composiciones inmunoterapéuticas adicionales comprende un antígeno de cáncer adicional. En antígeno adicional puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica o descritos en la presente memoria, incluyendo, pero no limitado a, Ras mutado, antígeno carcinoembrionario (CEA) y MUC-1.

En otro caso de la invención, un método para tratar cáncer incluye las siguientes etapas: (a) administrar a un individuo que tiene cáncer una primera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno Ras mutado; (b) administrar al individuo de (a) una segunda composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario (CEA) y mucina-1 (MUC-1); y (c) administrar al individuo de (a) y (b) una tercera composición inmunoterapéutica que comprende un vehículo de levadura y un antígeno Brachyury. Una o más de las etapas de administración en (a), (b) y (c) se pueden realizar concurrentemente o de manera secuencial. Las etapas se pueden repetir según sea necesario para tratar un cáncer particular del individuo, y los antígenos de cáncer se pueden modificar antes o durante el tratamiento para afrontar específicamente el cáncer particular del individuo.

En el método de la presente invención, se pueden administrar composiciones y composiciones terapéuticas al animal, incluyendo cualquier vertebrado, y particularmente a cualquier miembro de la clase de vertebrados, *Mammalia*, incluyendo, sin limitación, primates, roedores, ganado y animales domésticos. El ganado incluye mamíferos que se consumen o que producen productos útiles (por ejemplo, ovejas para la producción de lana). Los mamíferos a tratar o proteger utilizando la invención incluyen seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ratones, ratas, ovejas, cabras, ganado, vacas, caballos y cerdos.

Un "individuo" es un vertebrado, tal como un mamífero, incluyendo, sin limitación, un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, ratones y ratas. El término "individuo" se puede usar de manera intercambiable con el término "animal", "sujeto" o "paciente".

Técnicas generales útiles en la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, e inmunología, que se conocen bien por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, *Methods of Enzymology*, Vol. 194, Guthrie *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *Biology and activities of yeasts*, Skinner, *et al.*, eds., Academic Press (1980); *Methods in yeast genetics : a laboratory course manual*, Rose *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*, Pringle *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); *The Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Jones *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); *The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*, Broach *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (denominados conjuntamente en la presente memoria como "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, incluyendo complementos hasta 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Harlow y Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (denominados conjuntamente en la presente memoria como "Harlow y Lane"), Beaucage *et al.* eds., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000); Casarett and Doull's *Toxicology The Basic Science of Poisons*, C. Klaassen, ed., 6ª edición (2001), y *Vaccines*, S. Plotkin, W. Orenstein, y P. Offit, eds., quinta edición (2008).

Definiciones generales

Un "TARMOGEN[®]" (Globelimmune, Inc., Louisville, Colorado) se refiere en general a un vehículo de levadura que expresa uno o más antígenos heterólogos de manera extracelular (en su superficie), intracelularmente (de manera

interna o de manera citosólica) o tanto de manera extracelular como de manera intracelular. Se han descrito en general TARMOGEN® (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.830.463). Ciertas composiciones de monoterapia a base de levadura, y métodos para producir y usar en general las mismas, también se describen en detalle, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.830.463, Patente de Estados Unidos n.º 7.083.787, Patente de Estados Unidos n.º 7.736.642, Stubbs *et al.*, Nat. Med. 7: 625-629 (2001), Lu *et al.*, Cancer Research 64: 5084-5088 (2004), y en Bernstein *et al.*, Vaccine 2008 Jan 24; 26(4): 509-21, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Como se usa en la presente memoria, el término "análogo" se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a otro compuesto pero difiere ligeramente en la composición (como en el reemplazo de un átomo por un átomo de un elemento diferente o en la presencia de un grupo funcional particular, o el reemplazo de un grupo funcional por otro grupo funcional). Por lo tanto, un análogo es un compuesto que es similar o comparable en función y apariencia, pero tiene una estructura diferente u origen diferente con respecto al compuesto de referencia.

Las expresiones "sustituido", "derivados sustituidos" y "derivado", cuando se usan para describir un compuesto, significan que al menos un hidrógeno unido al compuesto no sustituido se reemplaza con un átomo diferente o un resto químico.

Aunque un derivado tiene una estructura física similar al compuesto precursor, el derivado puede tener diferentes propiedades químicas y/o biológicas que el compuesto precursor. Dichas propiedades pueden incluir, pero no se limitan a, actividad aumentada o disminuida del compuesto precursor, nueva actividad en comparación con el compuesto precursor, biodisponibilidad mejorada o disminuida, eficiencia mejorada o disminuida, estabilidad mejorada o disminuida *in vitro* y/o *in vivo*, y/o propiedades de absorción mejoradas o disminuidas.

En general, el término "biológicamente activo" indica que un compuesto (incluyendo una proteína o péptido) tiene al menos una actividad detectable que tiene un efecto en los procesos metabólicos, fisiológicos, químicos u otros procesos de una célula, un tejido, o un organismo, como se mide o se observa *in vivo* (es decir, en un entorno fisiológico natural) o *in vitro* (es decir, bajo condiciones de laboratorio).

Según la presente invención, el término "modular" se puede usar de manera intercambiable con "regular" y se refiere en general a la regulación por aumento o regulación por disminución de una actividad particular. Como se usa en la presente memoria, la expresión "regulación por aumento" se puede usar en general para describir cualquiera de: producción, inicio, incremento, aumento, refuerzo, mejora, potenciación, amplificación, promoción o provisión, con respecto a una actividad particular. De manera similar, la expresión "regulación por disminución" se puede usar en general para describir cualquiera de: disminución, reducción, inhibición, mejora, reducción, bloqueo o prevención, con respecto a una actividad particular.

En un caso de la presente invención, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria se pueden producir con al menos uno y hasta aproximadamente 20 aminoácidos heterólogos adicionales que flanquean cada uno de los extremos C y/o N-terminales de la secuencia especificada de aminoácidos. La proteína o polipéptido resultante se puede denominar como "que consiste esencialmente en" la secuencia especificada de aminoácidos. Según la presente invención, los aminoácidos heterólogos son una secuencia de aminoácidos que no se encuentran de manera natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia específica de aminoácidos, o que no están relacionados con la función de la secuencia especificada de aminoácidos, o que no se codificarán por los nucleótidos que flanquean la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica la secuencia especificada de aminoácidos como se presenta en el gen, si dichos nucleótidos en la secuencia de origen natural se tradujeran usando el uso de codón convencional por el organismo del que se deriva la secuencia dada de aminoácidos. De manera similar, la expresión "que consiste esencialmente en" cuando se usa con referencia a una secuencia de ácido nucleico en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia especificada de aminoácidos que puede estar flanqueada por al menos uno, y hasta como mucho aproximadamente 60, nucleótidos heterólogos adicionales en cada uno del extremo 5' y/o 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia especificada de aminoácidos. Los nucleótidos heterólogos no se encuentran de manera natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia especificada de aminoácidos como sucede en el gen natural o no codifican una proteína que imparte alguna función adicional a la proteína o cambia la función de la proteína que tiene la secuencia especificada de aminoácidos.

Según la presente invención, la expresión "se une selectivamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, de un fragmento de unión a antígeno o de un compañero de unión, de la presente invención, para unirse preferencialmente a proteínas especificadas. Más específicamente, la expresión "se une selectivamente a" se refiere a la unión específica de una proteína a otra (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento del mismo o compañero de unión a un antígeno), en donde el nivel de unión, según se mide por cualquier ensayo convencional (por ejemplo, un inmunoensayo), es estadísticamente mayor de manera significativa que el control de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza un inmunoensayo, los controles incluyen típicamente un pocillo/tubo de reacción que contiene el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en solitario (es decir, en ausencia del antígeno), en donde una cantidad de reactividad (por ejemplo, unión no específica al pocillo) por el anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno del mismo en ausencia del antígeno, se considera como el fondo. Se puede medir la unión usando una diversidad de métodos convencionales en la técnica que incluyen inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA, ensayos de inmunotransferencia, etc.).

La referencia general a una proteína o polipéptido usado en la presente invención incluye proteínas de longitud completa, proteínas de casi longitud completa (definidas anteriormente), o cualquier fragmento, dominio (estructural, funcional o inmunógeno), epítipo conformacional, o un homólogo o variante de una proteína determinada. También se puede denominar en general una proteína de fusión como una proteína o polipéptido. Una proteína aislada, según la presente invención, es una proteína (que incluye un polipéptido o péptido) que se ha retirado de su entorno natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana) y que puede incluir proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas producidas de forma recombinante, y proteínas producidas sintéticamente, por ejemplo. Como tal, "aislado" no refleja el grado al cual se ha purificado la proteína. Preferiblemente, se produce de manera recombinante una proteína aislada de la presente invención. Según la presente invención, los términos "modificación" y "mutación" se pueden usar de manera intercambiable, particularmente con respecto a las modificaciones/mutaciones a la secuencia de aminoácidos de proteínas o porciones de las mismas (o secuencias de ácidos nucleicos) que se describen en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término "homólogo" o "variante" se usa para referirse a una proteína o péptido que difiere de una proteína o péptido de referencia (es decir, el "prototipo" o proteína "de tipo silvestre") por modificaciones menores con respecto a la proteína o péptido de referencia, pero que mantiene la proteína básica y la estructura de cadena lateral de la forma que se presenta de forma natural. Dichos cambios incluyen, pero no se limitan a: cambios en una o algunas cadenas laterales de aminoácidos; cambios en uno o algunos aminoácidos, incluyendo delecciones (por ejemplo, una versión truncada de la proteína o péptido), inserciones y/o sustituciones; cambios en la estereoquímica de uno o algunos átomos; y/o derivaciones menores, incluyendo pero no limitado a: metilación, glicosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, amidación y/o adición de glicosilfosfatidil inositol. Un homólogo o variante puede tener propiedades mejoradas, disminuidas sustancialmente similares en comparación con la proteína o péptido de interés. Un homólogo variante puede incluir un agonista de una proteína o un antagonista de una proteína. Se pueden producir homólogos o variantes usando técnicas conocidas en la técnicas para la producción de proteínas incluyendo, pero no se limitan a, modificaciones directas a la proteína de referencia aislada, síntesis directa de proteínas, o modificaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína usando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante o clásicas para realizar la mutagénesis aleatoria o dirigida, dando como resultado la codificación de una variante de proteína. Además, las variantes que se presentan de forma natural de una proteína de referencia pueden existir (por ejemplo, isoformas, variantes alélicas u otras variantes naturales que puedan presentarse de individuo a individuo) y se pueden aislar, producir y/o utilizar en la invención.

Un homólogo o variante de una proteína dada puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 45 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 55 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 65 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 75 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 86 % idéntica, o al menos aproximadamente un 87 % idéntica, o al menos aproximadamente un 88 % idéntica, o al menos aproximadamente un 89 % idéntica, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 91 % idéntica, o al menos aproximadamente un 92 % idéntica, o al menos aproximadamente un 93 % idéntica, o al menos aproximadamente un 94 % idéntica, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica, o al menos aproximadamente un 96 % idéntica, o al menos aproximadamente un 97 % idéntica, o al menos aproximadamente un 98 % idéntica, o al menos aproximadamente un 99 % idéntica (o cualquier porcentaje de identidad entre el 45 % y el 99 %, en aumentos de números enteros), a la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos especificada en la presente memoria, o la secuencia de aminoácidos de una proteína especificada). En un caso, el homólogo o variante comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es menos de un 100 % idéntica, menos de aproximadamente un 99 % idéntica, menos de aproximadamente un 98 % idéntica, menos de aproximadamente un 97 % idéntica, menos de aproximadamente un 96 % idéntica, menos de aproximadamente un 95 % idéntica, etc., en aumentos del 1 %, a menos de aproximadamente un 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia.

Como se usa en la presente memoria, a menos que se especifique de otro modo, la referencia un porcentaje (%) de identidad se refiere a una evaluación de homología que se realiza usando: (1) una búsqueda de homología básica con la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (BLAST) usando blastp para búsquedas de aminoácidos y blastn para búsquedas de ácidos nucleicos con parámetros por defecto estándar, en donde la secuencia de consulta se filtra para regiones de baja complejidad por defecto (tal como se describe en Altschul, S.F., Madden, T.L., Schääffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad); (2) una alineación BLAST de dos secuencias (por ejemplo, usando los parámetros descritos más adelante); (3) y/o PSI-BLAST con los parámetros por defecto convencionales (BLAST iterado específico por posición). Se señala que, debido a algunas diferencias en los parámetros convencionales entre BLAST Básico y BLAST para las dos secuencias, se puede reconocer que dos secuencias específicas tienen homología significativa usando el programa BLAST, mientras que una búsqueda realizada en

BLAST Básico usando una de las secuencias como la secuencia de consulta puede no identificar la segunda secuencia en las mejores correspondencias. Además, PSI-BLAST proporciona una versión automatizada fácil de usar de una búsqueda de "perfil" que es una manera sensible de buscar homólogos de secuencia. El programa realiza primero una búsqueda en base de datos BLAST con separaciones. El programa PSI-BLAST usa la información de cualquier alineación significativa devuelta para construir una matriz de puntuación específica de la posición, que reemplaza la secuencia de consulta por la siguiente ronda de búsqueda de base de datos. Por lo tanto, se entenderá que el porcentaje de identidad se puede determinar usando cualquiera de estos programas.

Pueden alinearse dos secuencias específicas entre sí usando BLAST como se describe en Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250. Tal alineación de secuencias se realiza en blastp o blastn usando el algoritmo BLAST 2.0 para realizar una búsqueda BLAST con separaciones (BLAST 2.0) entre las dos secuencias lo que permite la introducción de separaciones (supresiones e inserciones) en la alineación resultante. Para propósitos de claridad en la presente memoria, una alineación de secuencias BLAST para dos secuencias se realiza usando los parámetros por defecto convencionales como se indica a continuación.

Para blastn, usando la matriz 0 BLOSUM62:

Recompensa para correspondencia = 1

Penalización por falta de correspondencia = -2

Penalizaciones por separación abierta (5) y separación de extensión (2)

separación x_dropoff(50) esperar (10) tamaño de palabra (11) filtrar (en)

Para blastp, usando la matriz 0 BLOSUM62:

Penalizaciones por separación abierta (11) y separación de extensión (1)

separación x_dropoff (50) esperar (10) tamaño de palabra (3) filtrar (en).

Una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que se ha sacado de su entorno natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en el que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Como tal, "aislado" no refleja necesariamente el grado al cual se ha purificado la molécula de ácido nucleico, sino que indica que la molécula no incluye un genoma entero o un cromosoma entero o un segmento del genoma que contiene más de un gen, en el cual se encuentra en la naturaleza la molécula de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir un gen completo. Una molécula de ácido nucleico aislada, que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye este gen, sino más bien incluye la región codificante y regiones reguladoras asociadas con el gen, pero ningún gen adicional que se encuentre de manera natural en el mismo cromosoma. Una molécula aislada de ácido nucleico también puede incluir porciones de un gen. Una molécula aislada de ácido nucleico también puede incluir una secuencia especificada de ácido nucleico flanqueada por (es decir, en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia) ácidos nucleicos adicionales que no flanquean normalmente la secuencia especificada de ácido nucleico en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas). La molécula aislada de ácido nucleico puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm), o derivados de ADN o ARN (por ejemplo, ADNc). Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos expresiones se pueden usar de manera intercambiable, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico, que es capaz de codificar una proteína o dominio de una proteína.

Una molécula recombinante de ácido nucleico es una molécula que puede incluir al menos una de cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica una cualquiera o más proteínas descritas en la presente memoria unidas operativamente al menos a una de cualquier secuencia de control de transcripción capaz de regular de manera eficaz la expresión de las moléculas de ácido nucleico en la célula que se ha de transfectar. Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos expresiones se pueden usar de manera intercambiable, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico, que es capaz de codificar una proteína. Además, la expresión "molécula recombinante" se refiere principalmente a una molécula de ácido nucleico unida operativamente a una secuencia de control de transcripción, pero se puede usar de manera intercambiable con la expresión "molécula de ácido nucleico" que se administra a un mamífero.

Una molécula recombinante de ácido nucleico incluye un vector recombinante que es cualquier secuencia de ácido nucleico, típicamente una secuencia heteróloga, que está unida operativamente a la molécula aislada de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la presente invención, que es capaz de permitir la producción recombinante de la proteína de fusión y que es capaz de distribuir la molécula de ácido nucleico en una célula huésped según la presente invención. Tal vector puede contener secuencias de ácido nucleico que no se encuentran

en la naturaleza adyacentes a las moléculas aisladas de ácido nucleico a insertar en el vector. El vector puede ser ARN o ADN, procariota o eucariota, y preferiblemente en la presente memoria invención, es un plásmido útil para transfectar levadura. Se pueden usar vectores recombinantes en la clonación, secuenciación y/o manipulación de otro modo de las moléculas de ácido nucleico, y se pueden usar en la distribución de esta molécula (por ejemplo, como en una composición de ADN o una composición a base de vector vírico). Los vectores recombinantes se usan preferiblemente en la expresión de moléculas de ácido nucleico y también se pueden denominar como vectores de expresión. Los vectores recombinantes preferidos son capaces de expresarse en una célula huésped transfectada, tal como una levadura.

En una molécula recombinante de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico se unen operativamente a vectores de expresión que contienen secuencias reguladoras, tales como secuencias de control de transcripción, secuencias de control de traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula huésped y que controlan la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención. En particular, las moléculas recombinantes de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico que están unidas operativamente a una o más secuencias de control de expresión. La expresión "unido operativamente" se refiere a la unión de una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la expresión de tal forma que la molécula se expresa cuando se transfecta (es decir, se transforma, transduce o transfecta) en una célula huésped.

Según la presente invención, el término "transfección" se usa para referirse a cualquier método por el cual se puede insertar una molécula exógena de ácido nucleico (es decir, una molécula recombinante de ácido nucleico) en una célula. El término "transformación" se puede usarse de forma intercambiable con el término "transfección" cuando se usa dicho término para referirse a la introducción de moléculas de ácido nucleico en células microbianas, tales como algas, bacterias y levadura. En los sistemas microbianos, el término "transformación" se usa para describir un cambio heredado debido a la adquisición de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo y es esencialmente sinónimo con el término "transfección". Por lo tanto, las técnicas de transfección incluyen, pero no se limitan a, transformación, tratamiento químico de células, bombardeo de partículas, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.

Los siguientes resultados experimentales se proporcionan para fines de ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe la producción de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury.

En este experimento, se diseñó levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) para expresar Brachyury humano bajo el control del promotor inducible por cobre, *CUP1*, o el promotor constitutivo, *TEF2*, produciendo composiciones de inmunoterapia de levadura-Brachyury. En cada caso, se produjo una proteína de fusión que comprendía un antígeno Brachyury como un polipéptido individual con los siguientes elementos de secuencia fusionados en el marco del extremo N a C representado por la SEQ ID NO:8 (1) un péptido N-terminal para impartir resistencia a degradación proteasómica y estabilizar la expresión (posiciones 1 a 6 de SEQ ID NO:8, secuencia peptídica también representada en la presente memoria por SEQ ID NO:11); 2) aminoácidos 2-435 de SEQ ID NO:6, representando SEQ ID NO:6 una proteína Brachyury humana casi de longitud completa (posiciones 7-440 de SEQ ID NO:8); y (3) una etiqueta de hexahistidina (posiciones 441-446 de SEQ ID NO:8). Las secuencias de aminoácidos usadas en esta proteína de fusión se pueden modificar por el uso de aminoácidos adicionales o alternos que flanquean cada extremo del antígeno Brachyury, si se desea, y también se pueden usar porciones más cortas del antígeno Brachyury. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de SEQ ID NO:8 (codón optimizado para expresión de levadura) se representa en la presente memoria por SEQ ID NO:7.

En resumen, el ADN que codifica una proteína Brachyury humana de longitud completa de un plásmido de Brachyury-PCRII proporcionado por el National Cancer Institute (Dr. Jeffrey Schlom) se amplificó usando PCR, y luego se insertó en los sitios de clonación *EcoRI* y *SpeI* detrás del promotor *CUP1* (vector pGI-100) o el promotor *TEF2* (vectores plu011 o pGI-172) en vectores de expresión de levadura de 2 µm. También se añadieron secuencias de nucleótidos que codifican el péptido de estabilización N-terminal, MADEAP (SEQ ID NO:11) y un péptido de hexahistidina C-terminal al vector plasmídico para codificar la proteína de fusión completa representada por la SEQ ID NO:8. Los plásmidos resultantes se transformaron en DH5α para almacenamiento de plásmidos, y en *Saccharomyces cerevisiae* W303α para la producción de las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury.

La transformación en *Saccharomyces cerevisiae* se realizó por transfección de acetato de litio/polietylenglicol, y se seleccionaron transfectantes primarios en placas mínimas sólidas que carecían de Uracilo (UDM; medio carente de uridina). Las colonias se seleccionaron por cultivo en medio U2 (medio carente de uridina) o UL2 (medio carente de uridina y leucina) a 30 °C.

La composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión Brachyury humana representada por la SEQ ID NO:8 bajo el control del promotor *CUP1* también se denomina en la presente memoria como GI-6301.

La composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión Brachyury humana representada por la SEQ ID NO:8 bajo el control del promotor *TEF2* (en vector plu011) también se denomina en la presente memoria como GI-6302. La composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión Brachyury humana representada por la SEQ ID NO:8 bajo el control del promotor *TEF2* (en vector pGI-172) también se denomina en la presente memoria como GI-6303.

Los cultivos líquidos que carecen de uridina (U2) o que carecen de uridina y leucina (UL2) se inocularon usando las placas y cultivos iniciadores descritos anteriormente, y se cultivaron durante 20 h a 30 °C, 250 rpm. También se inoculó medio tamponado de pH que contenía 4,2 g/l de Bis-Tris (BT-U2; BT-UL2) para evaluar los productos inmunoterapéuticos de levadura-Brachyury producidos bajo condiciones de fabricación a pH neutro (datos no mostrados). Se usaron cultivos primarios para inocular cultivos finales de la misma formulación.

Receta para el medio líquido U2:

- 15 g/l de glucosa
- 6,7 g/l de sulfato de amonio que contiene base de nitrógeno de levadura
- 0,04 g/l de cada uno de histidina, triptófano, adenina y 0,06 g/l de leucina

Receta para el medio líquido UL2:

- 15 g/l de glucosa
- 6,7 g/l de sulfato de amonio que contiene base de nitrógeno de levadura
- 0,04 g/l de cada uno de histidina, triptófano y adenina

En experimentos iniciales que comparan las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury bajo el control de diferentes promotores, se inició la expresión de levadura-Brachyury impulsada por *CUP1* (expresión inducible) por la adición de sulfato de cobre 0,5 mM después de que el cultivo de levadura-Brachyury alcanzó una densidad de aproximadamente 0,2 Y.U./ml, y se continuó hasta que el cultivo alcanzó una densidad de 0,5-1,5 Y.U. (levadura-Brachyury se duplicó solo aproximadamente 1-1,5 después de la adición de sulfato de cobre, pero se produjo una gran cantidad de proteína Brachyury por las células). La expresión de levadura-Brachyury impulsada por *TEF2* es constitutiva, y el crecimiento de estas células se continuó hasta que los cultivos alcanzaron una densidad de entre 1,1 a 4,0 Y.U./ml. Las células de cada cultivo se recolectaron entonces, se lavaron y aniquilaron térmicamente a 56 °C durante 1 hora en PBS. Las células vivas de cada cultivo también se procesaron para su comparación.

Después de la aniquilación térmica de los cultivos, las células se lavaron tres veces en PBS. Se midió la expresión total de proteína por un ensayo de unión de nitrocelulosa/precipitación de TCA y por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-his tag y un anticuerpo anti-Brachyury (Abcam, Cambridge, MA). Se cuantificó el contenido de proteína usando métodos semi-cuantitativos de formación de imágenes digitales.

Los resultados de los experimentos de expresión inicial (datos no mostrados) demostraron que cada una de las composiciones de inmunoterapia de levadura-Brachyury de la invención expresaron la proteína de fusión de Brachyury, es decir, usando el promotor *CUP1* o el promotor *TEF2*, y se detectó la expresión usando cualquier medio (U2 y UL2). Además, la expresión de antígeno se pudo detectar tanto en células aniquiladas con calor como vivas de levadura (datos no mostrados). La expresión de Brachyury fue significativamente mayor en la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury que comprendía el promotor *CUP1* (GI-6301) y así, esta composición se seleccionó para estudios adicionales, incluyendo optimización de expresión y para experimentos *in vitro* e *in vivo* (véanse los Ejemplos a continuación).

La figura 1A muestra la expresión de Brachyury en GI-6301 usando ambos medios U2 y UL2 usando el anticuerpo anti-Brachyury para la detección. La levadura de control que expresaba un antígeno no Brachyury no se tiñó con el anticuerpo. La figura 1B muestra la expresión de Brachyury en las mismas preparaciones de GI-6301, usando anti-His para identificar la etiqueta de hexahistidina en la proteína de fusión de Brachyury. También se muestra la levadura de control que expresa un antígeno no Brachyury, pero que tiene una etiqueta de hexahistidina. Estos resultados mostraron buena expresión de Brachyury usando cualquier medio, aunque la expresión en medio UL2 fue significativamente mayor.

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo describe la identificación de condiciones para la expresión de antígeno y la fabricación de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury, GI-6301.

Para determinar la densidad óptima para la inducción por cobre de la expresión de antígeno GI-6301, se prepararon cultivos iniciadores e intermedios de GI-6301 usando las condiciones normales de crecimiento en el medio UL2 descrito en el Ejemplo 1 anterior. Después, se diluyeron alícuotas del cultivo a 0,5 Y.U./ml, 1,0 Y.U./ml y 1,5 Y.U./ml

y se incubaron a 30 °C durante 1 hora. Se añadió adición CuSO₄ 0,5 mM a los cultivos para inducir la expresión de Brachyury, y se continuó el cultivo. Las células se recolectaron y se contaron a las 6 horas y 14 horas para medición de la densidad celular. Se lisaron 20 Y.U. de levadura aniquilada térmicamente de cada condición, se midió la proteína total, y las Western blot se generaron usando anti-His.

5 **Tabla 1**

	Tiempo de inducción		
	0 horas	6 horas	14 horas
Densidad celular (Y.U./ml)	0,5	1,03	0,96
	1,0	1,88	1,74
	1,5	3,14	2,7

Como se muestra en la Tabla 1, la levadura solo se duplicó aproximadamente 1 vez después de la inducción con cobre (otros experimentos mostraron hasta 1,5 x de duplicación), y la densidad y viabilidad celular (no mostradas) disminuyó después de 6 horas de inducción con cobre. La figura 2 muestra que las tres densidades de inducción dieron como resultado una expresión significativa de Brachyury, con una tendencia hacia una mayor expresión de Brachyury a mayores densidades de inducción. Sin embargo, los experimentos adicionales usando densidades de inicio de inducción de 2,1 Y.U./ml y 2,8 Y.U./ml y 375 µM de CuSO₄ mostraron que la expresión de proteínas comenzó a disminuir conforme aumentó la densidad de los cultivos al inicio de la inducción con cobre, y no mejoró significativamente después de aproximadamente 6-8 horas (datos no mostrados).

A continuación, se investigó el efecto de la cantidad de CuSO₄ en la expresión de Brachyury. Se cultivó GI-6301 de los cultivos iniciadores intermedios en el medio UL2 como se describe en el Ejemplo 1. Después, se diluyeron alícuotas del cultivo a 1,0 Y.U./ml y se incubaron a 30 °C durante 1 hora. Se añadió CuSO₄ a cada cultivo a una concentración de 375 µM o 500 µM, y se permitió que prosiguiera la inducción de la expresión de proteína a varios puntos de tiempo (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h), momento en el que las células se recolectaron, se aniquilaron térmicamente y se procesaron para la evaluación de la expresión de proteína usando Western blot anti-His como se describe anteriormente. Aunque ambas concentraciones de CuSO₄ dieron como resultado una buena expresión de Brachyury, la expresión de proteína usando 375 µM pareció ligeramente mejor, particularmente en puntos de tiempo tardíos (datos no mostrados).

Por consiguiente, para levadura-Brachyury impulsada por *CUP1* (expresión inducible), los inventores descubrieron que la inducción de la expresión de antígeno a un crecimiento en fase semilogarítmica de la levadura fue óptima para la producción de antígeno. Para la producción de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury (GI-6301) usada en los Ejemplos, se cultivaron células en medio UL2 como se describe en el Ejemplo 1 a entre 1 y 2 Y.U./ml, y se indujeron entonces por la adición de sulfato de cobre 0,375-0,5 mM durante hasta 6-8 horas a 30 °C, 250 rpm. Las células se recolectaron, se lavaron y aniquilaron térmicamente a 56 °C durante 1 h en PBS.

30 **Ejemplo 3**

El siguiente ejemplo describe la construcción y producción de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury adicional, en la que el antígeno Brachyury contiene un epítipo agonista de linfocitos T.

En este experimento, se diseñó levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) para expresar un antígeno Brachyury humano que era una proteína Brachyury casi de longitud completa que comprendía el epítipo de linfocitos T WLLPGTSTV (SEQ ID NO:13), que es un epítipo agonista. El epítipo de linfocitos T de Brachyury nativo, presente en la SEQ ID NO:6 u 8, por ejemplo, es WLLPGTSTL (SEQ ID NO:12). El antígeno Brachyury agonista humano se expresó bajo el control del promotor inducible por cobre, *CUP1*, produciendo una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury. Más particularmente, se produjo una proteína de fusión que comprendía un antígeno Brachyury agonista (es decir, un antígeno Brachyury que contenía al menos un epítipo agonista) como un polipéptido individual con los siguientes elementos de secuencia fusionados en el marco del extremo N a C representado por la SEQ ID NO:20 (1) un péptido N-terminal para impartir resistencia a degradación proteasómica y estabilizar la expresión (posiciones 1 a 6 de SEQ ID NO:20, secuencia peptídica también representada en la presente memoria por SEQ ID NO:11); 2) aminoácidos 2-435 de la SEQ ID NO:18 (representados por las posiciones 7-440 de la SEQ ID NO:20; la SEQ ID NO:18 representa una proteína agonista Brachyury humana de longitud completa que tiene una única sustitución aminoacídica en la posición 254 en comparación con la proteína Brachyury de tipo silvestre); y (3) una etiqueta de hexahistidina (posiciones 441-446 de la SEQ ID NO:20). El epítipo agonista (SEQ ID NO:13) se sitúa en las posiciones 251 a 259 de la SEQ ID NO:20 (posiciones 246 a 254 de SEQ ID NO:18). Las secuencias de aminoácidos usadas en esta proteína de fusión se pueden modificar por el uso de aminoácidos adicionales o alternos que flanquean cada extremo del antígeno Brachyury, si se desea, y también se pueden usar porciones más cortas del antígeno Brachyury. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de SEQ ID NO:20

(codón optimizado para expresión de levadura) se representa en la presente memoria por SEQ ID NO:19.

En resumen, usando PCR se amplificó el ADN que codificaba la proteína Brachyury humana de casi longitud completa como se describe en el Ejemplo 1 (es decir, Brachyury de longitud completa menos metionina N-terminal), modificado por mutagénesis dirigida a sitio para introducir una sustitución de una valina por la leucina en la posición 254 con respecto a la proteína Brachyury de longitud completa, y después se insertó en los sitios de clonación *EcoRI* y *SpeI* detrás del promotor *CUP1* (vector pGI-100) en vectores de expresión de levadura de 2 μ m. También se añadieron secuencias de nucleótidos que codifican el péptido de estabilización N-terminal, MADEAP (SEQ ID NO:11) y un péptido de hexahistidina C-terminal al vector plasmídico para codificar la proteína de fusión completa representada por la SEQ ID NO:20. Los plásmidos resultantes se transformaron en DH5 α para almacenamiento de plásmidos, y en *Saccharomyces cerevisiae* W303 α para la producción de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury.

La transformación en *Saccharomyces cerevisiae* se realizó por transfección de acetato de litio/polietilenglicol, y se seleccionaron transfectantes primarios en placas mínimas sólidas que carecían de Uracilo (UDM; medio carente de uridina). Las colonias se seleccionaron por cultivo en UL2 (medio carente de uridina y leucina) a 30 °C.

La composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión agonista Brachyury humana representada por la SEQ ID NO:20 bajo el control del promotor *CUP1* también se denomina en la presente memoria como GI-6305.

Las células GI-6305 se cultivaron en medio UL2 como se ha descrito en el Ejemplo 1 a entre 1 y 2 Y.U./ml, y después se indujeron por la adición de sulfato de cobre 0,375-0,5 mM durante hasta 6-8 horas a 30 °C, 250 rpm, usando las condiciones desarrolladas por los inventores para GI-6301 como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las células se recolectaron, se lavaron y aniquilaron térmicamente a 56 °C durante 1 h en PBS.

Después de la aniquilación térmica de los cultivos, las células se lavaron tres veces en PBS. Se midió la expresión total de proteína por un ensayo de unión de nitrocelulosa/precipitación de TCA y por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-his tag y un anticuerpo anti-Brachyury (Abcam, Cambridge, MA). Se cuantificó el contenido de proteína usando métodos semi-cuantitativos de formación de imágenes digitales.

La figura 1C muestra la fuerte expresión del antígeno de agonista de Brachyury en GI-6305 usando anti-His para identificar la etiqueta de hexahistidina en la proteína de fusión de Brachyury. El contenido aproximado de antígeno para GI-6305 cultivado en el medio UL2 en este experimento fue >22615 ng/Y.U.

Ejemplo 4

El siguiente ejemplo demuestra la expansión de linfocitos T específicos de Brachyury usando una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención.

Para determinar si los linfocitos T de donantes normales fueron capaces de generar linfocitos T que son específicos para el antígeno Brachyury, se prepararon células dendríticas (DC) de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dos donantes normales. En resumen, se cultivaron PBMC aislados durante 5 días en la presencia de GM-CSF e IL-4, y se incubaron posteriormente con Levadura de Control (también denotada "YVEC", que es una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* que se transforma con un vector vacío, o vector que no contiene una inserción que codifica el antígeno) o Levadura de Brachyury (GI-6301, descrita en los Ejemplos 1 y 2 anteriores), a una relación de levadura:DC = 1:1. Después de 48 horas de co-cultivo, las DC se usaron como APC para estimulación de linfocitos T autólogos. Cada ciclo de estimulación, designado como IVS (estimulación *in vitro*), consistió de 3 días de cultivo en ausencia de IL-2, seguido de 4 días adicionales en presencia de IL-2 recombinante (20 U/ml). Al final de IVS 2, se tiñeron los linfocitos T con un tetrámero de control o un tetrámero específico para el péptido Brachyury Tp2 (WLLPGTSTL, posiciones 246 a 254 de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6). La Tabla 2 muestra el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que se tiñeron positivos con cada tetrámero.

Tabla 2

Donante	Estimulación	Tetrámero de control	Tetrámero de Brachyury
07706	Levadura de control	0,21	0,30
	Levadura de Brachyury	0,28	0,67
17663	Levadura de control	0,04	0,29
	Levadura de Brachyury	0,05	0,54

En un segundo experimento, se prepararon células dendríticas (DC) a partir de las PBMC de nueve donantes normales usando un cultivo de 5 días en presencia de GM-CSF e IL-4, se incubaron posteriormente con levadura Brachyury (GI-6301), a una relación levadura:DC = 1:1, como se describe anteriormente. Después de 48 horas en co-cultivo, las DC se usaron como APC para estimulación de linfocitos T autólogos. Cada ciclo de IVS se realizó como se describe anteriormente. Al final de IVS 2, se tiñeron los linfocitos T con un tetrámero de control o un tetrámero específico para el péptido Brachyury Tp2. La Tabla 3 muestra el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que se tiñeron positivos con cada tetrámero.

Tabla 3

Donante	Estimulación	Tetrámero de control	Tetrámero de Brachyury
07706	Levadura de Brachyury	0,28	0,67
17663	Levadura de Brachyury	0,05	0,54
32249	Levadura de Brachyury	0,01	1,24
29004	Levadura de Brachyury	0,02	0,36
19063	Levadura de Brachyury	0,10	2,57
06852	Levadura de Brachyury	0,05	0,33
26532	Levadura de Brachyury	0,07	0,11
12172	Levadura de Brachyury	0,01	0,11
26725	Levadura de Brachyury	0,01	0,20

Los resultados en las Tablas 2 y 3 muestran que la estimulación de linfocitos T de donante normal con un producto inmunoterapéutico de levadura-Brachyury de la invención aumenta el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ positivos a tetrámero en la mayoría de los donantes normales, en comparación con los controles, indicando que los linfocitos T humanos normales tienen la capacidad de reconocer Brachyury como un inmunógeno.

Ejemplo 5

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury para generar CTL específicos de Brachyury de PBMC de donantes normales que lisan las dianas que expresan Brachyury.

En este experimento, los linfocitos T específicos de Brachyury de tres de los donantes normales de la Tabla 2 anterior se expandieron *in vitro* usando DC incubadas con levadura de Brachyury (GI-6301) durante 2 ciclos de IVS (como se describe en el Ejemplo 4). Se realizó un tercer IVS con las DC maduras en presencia de CD40L y se sometieron a impulsos con el péptido Tp2 específico de Brachyury (WLLPGTSTL, posiciones 246 a 254 de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6). El día 5, se aislaron los linfocitos T CD8⁺ y se usaron en un ensayo de linfocitos T citotóxicos (CTL) durante una noche contra dianas de células tumorales SW480 (HLA-A2⁺/Brachyury alto) y MCF7 (HLA-A2⁺/Brachyury bajo), a las relaciones efector:diana (ET) indicadas (véase la figura 3). Se muestra en la Tabla 4 el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que se tiñeron positivos con un tetrámero de control frente a un tetrámero Tp2 específico de Brachyury.

Tabla 4

Donante normal	Estimulación	Tetrámero de control	Tetrámero de Brachyury
07706	Levadura de Brachyury/Tp2	0,33	1,84
17663	Levadura de Brachyury/Tp2	0,11	0,65
26532	Levadura de Brachyury/Tp2	0,05	0,11

Las figuras 3A (donante 07706), 3B (donante 17663) y 3C (donante 26532) muestran que las PBMC de dos de tres

donantes normales fueron capaces de generar CTL CD8⁺ que podrían eliminar dianas que expresaban Brachyury. Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que las composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury pueden generar CTL específicos de Brachyury que son capaces de eliminar una célula tumoral que expresa Brachyury.

A fin de mostrar que la inmunoterapia de levadura-Brachyury puede inducir CTL específicos de Brachyury en ausencia de los impulsos con un péptido específico (es decir, al generar CTL contra potencialmente múltiples epítopos de CTL diferentes), se realizaron experimentos adicionales usando linfocitos T de donantes normales expandidos *in vitro* usando solamente la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury, GI-6301 (es decir, sin impulso de péptido). En resumen, los linfocitos T específicos de Brachyury de las PBMC de donantes normales (donante 19063) se expandieron *in vitro* usando DC incubadas con GI-6301 durante 2 ciclos de IVS (como se describe en el Ejemplo 4). El día 5, los linfocitos T CD8⁺ se aislaron y se usaron en un ensayo de CTL durante una noche contra células tumorales SW480 (HLA-A2 positivo/Brachyury alto) y H226 (HLA-A2 negativo/Brachyury alto), a una relación de efector:diana (ET) de 15:1. La figura 4A muestra el porcentaje de lisis específica de las células tumorales SW480 y H226. La figura 4B muestra la expresión del ARNm de Brachyury con respecto al de GAPDH en células tumorales de SW480 y H226 por RT-PCR en tiempo real. Estos experimentos demuestran además que la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury puede generar CTL específicos de Brachyury que son capaces de eliminar una célula tumoral que expresa Brachyury.

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo demuestra que una composición de levadura-Brachyury de la invención puede expandir linfocitos T específicos de Brachyury de pacientes con cáncer.

En este experimento, se prepararon DC de las PBMC de dos pacientes con cáncer de mama, post-vacunación con vacunas de vector vírico que comprendían los antígenos CEA y MUC-1. Las DC se prepararon en un cultivo de 5 días en la presencia de GM-CSF e IL-4 como se describe en el Ejemplo 4, seguido de incubación en la presencia de levadura de Brachyury (GI-6301) a una relación de levadura:DC = 1:1. Después de 48 horas de co-cultivo, las DC se usaron como APC para estimulación de linfocitos T autólogos. Cada ciclo de IVS consistió en 3 días en ausencia de IL-2, seguido de 4 días adicionales en presencia de 20 U/ml de IL-2. Se muestra en la Tabla 5 el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (IVS1) que se tiñó positivo con un tetrámero de control o un tetrámero específico para el péptido Tp2 de Brachyury.

Tabla 5

<i>Paciente</i>	<i>Estimulación</i>	<i>Tetrámero de control</i>	<i>Tetrámero de Brachyury</i>
Mama Pt 01	Levadura de Brachyury	0,11	0,42
Mama Pt 10	Levadura de Brachyury	0,23	0,91

Los resultados en la Tabla 5 demuestran que la estimulación de linfocitos T de donantes de cáncer de mama con un producto inmunoterapéutico de levadura-Brachyury de la invención aumenta el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ positivos a tetrámero en la mayoría de los donantes, en comparación con controles, lo que indica que los linfocitos T de donantes con cáncer en curso tienen la capacidad de reconocer Brachyury como un antígeno.

Ejemplo 7

El siguiente Ejemplo demuestra la generación de respuestas de linfocitos T CD4⁺ específicas para Brachyury *in vivo* usando inmunoterapia de levadura-Brachyury.

En este experimento, se vacunaron ratones C57BL/6 semanalmente durante un total de 4 veces con 4 YU de levadura-Brachyury (GI-6301), administrado en cuatro sitios de inyección separados a 1 YU por sitio). Dos semanas después del refuerzo final, los ratones se sacrificaron y se purificaron los linfocitos T CD4⁺ y se analizaron para determinar la proliferación en presencia de diversas concentraciones de la proteína purificada de Brachyury (obtenida de células de insecto). Como control, se usó β -Gal a 40 μ g/ml.

Los resultados que muestran la proliferación de linfocitos T CD4⁺ aislados de los bazo de animales vacunados con levadura-control (YVEC, véase el Ejemplo 4) y levadura-hBrachyury (GI-6301) se muestran en la figura 5. La figura 5 muestra que la inmunización con levadura-Brachyury (GI-6301) genera linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury.

Ejemplo 8

El siguiente ejemplo demuestra que la inmunización con la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury reduce los tumores que expresan Brachyury *in vivo*.

En este experimento, ratones C57BL/6 recibieron 1×10^6 células MC38-phBrachyury (células de tumor MC38 que

expresan un Brachyury humano recombinante) a través de la vena de la cola (día 0). Cuatro días después del implante del tumor, los animales comenzaron a recibir vacunaciones semanales con levadura de control (YVEC, véase el Ejemplo 4) frente a levadura-hBrachyury (GI-6301), administrados a una dosis de 1YU por sitio en cuatro diferentes sitios (4YU total por dosis). El día 40 después de la implantación del tumor, los animales se sacrificaron y se evaluó el número de nódulos tumorales de pulmón. En la figura 6 se muestran resultados de dos experimentos combinados. La Tabla 6 muestra el número medio de tumores de pulmón ($\pm$ SEM) y el número (y porcentaje) de animales que tienen ≥ 5 nódulos de pulmón.

Tabla 6

Tratamiento de vacuna	Tumores de pulmón (media $\pm$ SEM)	Animales portadores de ≥ 5 nódulos pulmonares (%)
Levadura-Control (YVEC)	4,1 $\pm$ 1,2	7/15 (46,7 %)
Levadura-Brachyury (GI-6301)	1,9 $\pm$ 0,5	2/15 (13,3 %)

Los resultados en la figura 6 y en la Tabla 6 demuestran que la administración de una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la invención es capaz de reducir tumores que expresan Brachyury en ratones, en comparación con ratones que reciben levadura en solitario (sin antígeno Brachyury).

Ejemplo 9

El siguiente ejemplo demuestra la generación de respuestas de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury *in vitro* usando inmunoterapia de levadura-Brachyury en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas obtenidas de donantes sanos.

En los siguientes experimentos, se expresó una proteína Brachyury humana de longitud completa en células de insecto a través de la expresión en baculovirus y posteriormente se purificó.

Se prepararon células dendríticas (DC) de las PBMC de donantes sanos por cultivo de 5 días con GM-CSF e IL-4 y se trataron posteriormente *in vitro* con levadura-control (YVEC, véase el Ejemplo 4) o levadura-Brachyury (GI-6301, véanse los Ejemplos 1 y 2) (relación levadura:DC = 1:1). Después de 48 horas, las DC se recolectaron, se irradiaron (30 Gy) y se usaron para la estimulación de las PBMC autólogas, a una relación DC:PBMC = 1:10. El día 3, se añadió IL-2 (10 U/ml) a los cultivos. En el día 7, se recolectaron los linfocitos T estimulados y se trataron posteriormente para la producción de IFN- γ en respuesta a las PBMC irradiadas autólogas (relación linfocitos T: PBMC = 1:3) en solitario o en presencia de 10 μ g/ml de proteína Brachyury purificada o proteína de albúmina de suero humano de control. Después de 96 horas de estimulación, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluaron para determinar los niveles de IFN- γ por ensayo ELISA. Se evaluaron un total de 9 donantes sanos, demostrando 3/9 donantes respuestas de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury después de la estimulación *in vitro* con DC tratadas con levadura-Brachyury. Los resultados para 3 casos positivos se presentan en la Tabla 7 (los valores indican los niveles de IFN- γ en respuesta a la proteína Brachyury, después de restar los niveles de fondo inducidos por estimulación con proteína de albúmina sérica humana de control; para el donante 3, se realizaron dos ciclos de estimulación antes de evaluar la respuesta a la proteína Brachyury).

Tabla 7

ID de donante	Estimulación de DC	ΔIFN-γ (pg/ml)
1	Levadura-control	1500,0
	Levadura-Brachyury	2950,0
2	Levadura-control	13,4
	Levadura-Brachyury	889,0
3	Levadura-control	17,4
	Levadura-Brachyury	102,8

Se evaluaron seis donantes sanos adicionales para determinar las respuestas de linfocitos T CD4⁺ a la proteína Brachyury, tras la estimulación *in vitro* con DC tratadas con levadura-Brachyury (GI-6301) por tinción de citocinas intracelular de IFN- γ en células CD4⁺. Se prepararon células dendríticas de las PBMC de donantes sanos por cultivo de 5 días con GM-CSF e IL-4 y se trataron posteriormente *in vitro* con levadura-control (YVEC) o levadura-Brachyury (GI-6301) (relación levadura:DC = 1:1). Después de 48 horas, las DC se recolectaron, se irradiaron (30 Gy) y se usaron para la estimulación de las PBMC autólogas, a una relación DC:PBMC = 1:10. El día 3, se añadió IL-2 (10 U/ml) a los cultivos. En el día 7, se recolectaron los linfocitos T estimulados y se trataron posteriormente para la producción de IFN- γ en respuesta a las PBMC autólogas (relación linfocitos T: PBMC = 1:3) en solitario o en presencia de 10 μ g/ml de proteína Brachyury purificada o proteína de albúmina de suero humano de control. Después de 2 horas de estimulación, se añadió a los cultivos el inhibidor de transporte de proteínas BD GOLGISTOPTM (BD Biosciences). Después de 4 horas de estimulación, las células se recolectaron, se permeabilizaron y se tiñeron para CD4 e IFN- γ utilizando los anticuerpos anti-CD4 PerCP-Cy5.5 y anti-IFN- γ FITC (BD Biosciences). Se evaluaron un total de 6 donantes sanos, demostrando 2/6 donantes respuestas de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury después de la estimulación *in vitro* con DC tratadas con levadura-Brachyury. En la Tabla 8 se muestran los resultados para casos positivos (los valores indican el porcentaje de linfocitos T que fueron simultáneamente positivos para CD4 e IFN- γ intracelular en respuesta a albúmina de suero humano (HSA) de control o proteína Brachyury después de restar los niveles de fondo indicados por la estimulación con las PBMC en solitario).

Tabla 8

Donante	Número de estimulaciones <i>in vitro</i>	% de linfocitos CD4 ⁺ /IFN- γ ⁺	
		HSA	Brachyury
4	1	0,07	0,24
5	2	0,00	1,00

Ejemplo 10

El siguiente ejemplo demuestra que una composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury que expresa un antígeno Brachyury agonista genera linfocitos T específicos de Brachyury de un paciente con cáncer de próstata.

Para generar una línea de linfocitos T específicos de Brachyury, se expusieron células dendríticas (DC) autólogas inmaduras a la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury conocida en GI-6305 (véase el Ejemplo 3) a una relación de DC:GI-6305 = 1:1 durante 48 horas, y se usó posteriormente como las células que presentan antígeno (APC) para estimular células no adherentes autólogas a una relación de efector-APC de 10:1. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 37 °C, en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %, y se complementaron posteriormente con IL-2 humana recombinante una concentración de 20 U/ml durante 7 días más. El cultivo de 10 días consistió de un ciclo de estimulación *in vitro* (IVS). Los linfocitos T se estimularon de nuevo con DC autólogas expuestas de GI-6305 como se describe anteriormente el día 11, para empezar el siguiente ciclo IVS. Se usaron DC autólogas expuestas a GI-6305 como las APC para los tres ciclos de IVS. Después del tercer IVS, los linfocitos B transformados con EBV autólogos irradiados (23.000 rads), sometidos a impulsos con un péptido agonista de Brachyury, WLLPGTSTV (SEQ ID NO:13), se usaron como las APC. Se estableció una línea de linfocitos T específicos de Brachyury, representada, T-2-BR-A. Esta línea de linfocitos T se usó en los inmunoensayos descritos más adelante.

La Tabla 9 demuestra que los linfocitos T específicos de Brachyury (T-2-BR-A) liberan niveles significativos de IFN- γ después de la estimulación con las DC alogénicas tratadas con GI-6305, mientras que la levadura de control (YVEC, véase el Ejemplo 4) no estimuló la liberación de IFN- γ por células T-2-BR-A. Los resultados se expresan en pg/ml/10⁵ de linfocitos T. En resumen, las DC positivas a HLA-A2 alogénicas de un donante normal se trataron con GI-6305 durante 48 horas a diversas relaciones de levadura con respecto a DC (indicado en Tabla 9) y luego se usaron para estimular linfocitos T específicos de epítipo agonista de Brachyury (T-2-BR-A). En este experimento, la relación de DC con respecto a linfocitos T fue de 1:10.

Tabla 9

Células dendríticas	Tratamiento	Relación levadura/DC	Linfocitos T	IFN- γ
+	Levadura de control	10:1	-	<15,6
+	Levadura de control	10:1	+	<15,6
-	-	-	+	52,1

+	GI-6305	10:1	-	<15,6
+	GI-6305	10:1	+	589,0
+	GI-6305	5:1	-	<15,6
+	GI-6305	5:1	+	661,1
+	GI-6305	2,5:1	-	<15,6
+	GI-6305	2,5:1	+	341,3
+	GI-6305	1:1	-	<15,6
+	GI-6305	1:1	+	388,2

La Tabla 10 demuestra que los linfocitos T específicos de Brachyury establecidos usando DC tratadas con GI-6305 pueden lisar eficazmente células de cáncer de mama MDA-MB-231 que son positivas a HLA-A2/positivas a Brachyury, pero no lisan células de cáncer de páncreas ASPC-1 que son negativas a HLA-A2/positivas a Brachyury. En resumen, la línea de linfocitos T específicos de Brachyury T-2-BR-A se usó en IVS-6 en un ensayo de linfocitos T citotóxicos (CTL) durante una noche contra las dianas de células tumorales MDA-MB-231 (HLA-A2⁺/Brachyury⁺) y ASPC-1 (HLA-A2/Brachyury⁺), a las relaciones indicadas efector:diana (ET) (véase la Tabla 10). Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis específica.

Tabla 10

Relación E:T	MDA-MB-231	ASPC-1
25:1	52,2 (2,8)	-5,1 (2,6)
12,5:1	23,8 (1,4)	0,2 (5,6)
6,25:1	13,9 (4,4)	2,3 (3,3)

En otro experimento, se evaluó la capacidad de la línea celular T-2-BR-A para unirse a los tetrámeros HLA-A2 específicos de Brachyury. En resumen, se tiñeron las células T-2-BR-A (usadas en IVS-4) con un tetrámero de control o un tetrámero específico para el péptido agonista de Brachyury. Las figuras 7A y 7B muestran que el 10,8 % de los linfocitos T CD8⁺ en la línea celular T-2-BR-A generados con DC tratadas con GI-6305 se unen específicamente al tetrámero de Brachyury-HLA-A2 (figura 7B) y no a un tetrámero de control (figura 7A).

Se analizó la expresión de perforina de la línea de linfocitos T T-2-BR-A por citometría de flujo (la perforina es un mediador de la actividad citolítica de los linfocitos T citotóxicos (CTL)). En resumen, los linfocitos T se ensayaron el día 5 después de la reestimulación con linfocitos B transformados por EBV autólogos sometidos a impulsos con péptido agonista de Brachyury. La figura 8 muestra la expresión de perforina en la línea celular T-2-BR-A después de la estimulación con linfocitos B autólogos sometidos a impulsos con péptido agonista de Brachyury, demostrando adicionalmente la capacidad citotóxica de esta línea de linfocitos T específicos de Brachyury, que se generó usando DC tratadas con GI-6305.

Ejemplo 11

El siguiente ejemplo describe un estudio clínico de fase 1 en sujetos con cáncer positivo a Brachyury.

Se ha iniciado un estudio clínico de fase 1, abierto con escala de dosis secuencial usando la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury conocida como GI-6301, descrita en los Ejemplos 1, 2, y 4-9. Bajo este protocolo de estudio clínico, a 9-18 pacientes con cáncer (3-6 pacientes por cohorte de dosis) se les administra la composición de inmunoterapia de levadura-Brachyury conocida como GI-6301 en un protocolo de escala de cohorte de dosis secuencial utilizando intervalos de dosis de 4 Y.U. (1 Y.U. x 4 sitios, lo que significa que 1 Y.U. de GI-6301 se administra en 4 sitios diferentes en el cuerpo del paciente en cada visita), 16 Y.U. (4 Y.U. x 4 sitios) y 40 Y.U. (10 Y.U. x 4 sitios), administrados por vía subcutánea. Se administra GI-6301 a intervalos de 2 semanas durante un total de 7 visitas (~3 meses), y luego mensualmente en lo sucesivo hasta que el paciente cumple con los criterios fuera del estudio. Una cohorte de expansión de pacientes (n = 10) a la dosis máxima tolerada (MTD) o la mejor dosis observada se selecciona para un estudio adicional. Los resultados controlan la seguridad y tolerabilidad como un criterio de valoración primario, y en la cohorte expandida, ya sea detectable un cambio significativo en los precursores de linfocitos T según se mide por un aumento de los linfocitos T específicos de Brachyury en el ensayo ELISpot y la proliferación en respuesta a proteína Brachyury (por ejemplo, linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ específicos de

Brachyury que emergen o expanden en el tratamiento). Como criterios de valoración secundarios, se mide el beneficio clínico tal como supervivencia sin avance, respuesta radiográfica clínica, reducción en marcadores de suero, y/o reducción en células tumorales en circulación, así como parámetros de activación inmunitaria general, incluyendo la frecuencia de subconjuntos de células inmunitarias en sangre periférica (linfocitos T efectores/de memoria CD8⁺, linfocitos T efectores/de memoria CD4⁺, Tregs, células NK, DC) y cambios en los niveles de suero de citocinas (por ejemplo, IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-2, IL-4, TGF- β , etc.).

Se espera que GI-6301 sea seguro y bien tolerado sin una toxicidad significativa. Además, se espera que GI-6301 produzca respuestas de linfocitos T específicos de Brachyury emergentes al tratamiento o una mejora en las respuestas preexistentes de linfocitos T de línea base específicos de Brachyury al menos a algunos o en la mayoría de los pacientes. También se espera que algunos pacientes tengan enfermedad estabilizada.

En un estudio adicional o en una expansión de este estudio, la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury conocida como GI-6305 (véase el Ejemplo 3) se administra a una cohorte adicional de pacientes, utilizando la dosis máxima tolerada o mejor dosis observada determinada anteriormente, y se miden los mismos criterios de valoración primarios y secundarios. También se espera que GI-6305 sea seguro y bien tolerado sin toxicidad significativa, así como que produzca respuestas de linfocitos T específicos de Brachyury emergentes en el tratamiento o una mejora en las respuestas preexistentes de linfocitos T de línea base específicos de Brachyury al menos en algunos o en la mayoría de los pacientes. También se espera que algunos pacientes tengan enfermedad estabilizada.

Ejemplo 12

El siguiente ejemplo describe un estudio clínico de fase 2 que usa composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury.

Un estudio clínico de fase 2 aleatorizado en pacientes con cáncer de mama se realiza usando una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury como se describe en el Ejemplo 1 y 2 (por ejemplo, GI-6301) o en el Ejemplo 3 (GI-6305). Se incluyen al menos 100 o más sujetos con cáncer de mama positivo a Brachyury de estadio I, II o III. Los criterios de exclusión de sujetos pueden incluir sujetos con cánceres de grado 1, 2 o 3. Los criterios de inclusión de sujetos también pueden inducir sujetos con cáncer de mama "triple negativo" (cánceres que son negativos para cada uno de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2). Los criterios de inclusión de sujetos también pueden incluir pacientes con cáncer negativo en nódulos linfáticos.

El ensayo se realiza como un ensayo multicéntrico abierto, controlado por placebo. Todos los pacientes recibieron una terapia de cuidado convencional, recibiendo los pacientes en el grupo de tratamiento varias inyecciones en serie de la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury durante el tratamiento. El criterio de valoración primario es la supervivencia libre de recurrencia o supervivencia completa. Los criterios de valoración adicionales pueden incluir respuestas de linfocitos T específicos de antígeno (por ejemplo, linfocitos T CD8⁺ específicos de Brachyury que emergen o se expanden en el tratamiento), mantenimiento de la negatividad en nódulos linfáticos, avance a metástasis, y expresión de Brachyury en células tumorales.

Se espera que la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury sea segura y bien tolerada sin una toxicidad significativa. Además, se espera que la composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury produzca respuestas de linfocitos T específicos de Brachyury emergentes al tratamiento y/o una mejora en las respuestas preexistentes de linfocitos T de línea base específicos de Brachyury en al menos algunos o en la mayoría de los pacientes. También se espera que algunos o la mayoría de los pacientes tengan enfermedad estabilizada, mantengan la negatividad en los nódulos linfáticos, y/o la prevención, reducción o detección del avance metastático.

Lista de secuencias

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA, representado por Secretary, Department of Health GlobelImmune, Inc. Palena, Claudia Guo, Zhimin Apelian, David Schlom, Jeffrey

<120> Composiciones inmunoterapéuticas de levadura-Brachyury para el cáncer

<130> 3923-34-PCT

<150> 61/453.656

<151> 17-03-2011

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2518

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (494)..(1801)

<400> 1

tttgcttttg cttattttccg tccattttccc tctctgcgcg cggaccttcc ttttccagat	60
ggtgagagcc gcggggacac ccgacgccgg ggcaggctga tccacgatcc tgggtgtgcg	120
taacgccgcc tggggctccg tgggcgaggg acgtgtgggg acaggtgcac cggaaactgc	180
cagactggag agttgaggca tcggaggcgc gagaacagca ctactactgc ggcgagacga	240
gcgcggcgca tcccaaagcc cggccaaatg cgctcgtccc tgggagggga gggaggcgcg	300
cctggagcgg ggacagtctt ggtccgcgcc ctctcccgg gtctgtgccg ggacccggga	360
cccgggagcc gtcgcaggtc tcggtccaag gggccccttt tctcggaagg gcggcggcca	420
agagcagggg aggtggatct caggtagcga gtctgggctt cggggacggc ggggagggga	480
gccggacggg agg atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc	529
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser	
1 5 10	
ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg	577
Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu	
15 20 25	
cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg	625
Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val	
30 35 40	
ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat	673
Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn	
45 50 55 60	

ES 2 627 979 T3

gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys 65 70 75	721
gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu 80 85 90	769
gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu 95 100 105	817
tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr 110 115 120	865
atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro 125 130 135 140	913
gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly 145 150 155	961
cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile 160 165 170	1009
gtg aga gtt ggg ggt cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro 175 180 185	1057
gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr 190 195 200	1105
gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala 205 210 215 220	1153
aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser 225 230 235	1201
cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser 240 245 250	1249
acc ctg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu 255 260 265	1297
tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser 270 275 280	1345
cac cgg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser 285 290 295 300	1393
cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser	1441

ES 2 627 979 T3

305	310	315	
cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc			1489
His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu			
320	325	330	
ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc			1537
Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro			
335	340	345	
agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca			1585
Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala			
350	355	360	
gca gcc gtg tcc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc ccg ggc tcc ccc			1633
Ala Ala Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro			
365	370	375	380
gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gcg ccc tct tcc tcg			1681
Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser			
385	390	395	
gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca gac atc gtg gac			1729
Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp			
400	405	410	
agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca			1777
Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr			
415	420	425	
cct gtg tcg cca cct tcc atg tga agcagcaagg cccaggtccc gaaagatgca			1831
Pro Val Ser Pro Pro Ser Met			
430	435		
gtgacttttt gtcgtggcag ccagtggtga ctggattgac ctactaggta cccagtggca			1891
gtctcagggtt aagaaggaaa tgcagcctca gtaacttcct tttcaaagca gtggaggagc			1951
acacggcacc tttccccaga gccccagcat cccttgctca cacctgcagt agcggtgctg			2011
tcccaggtgg cttacagatg aacccaactg tggagatgat gcagttggcc caacctcact			2071
gacggtgaaa aaatgtttgc cagggtccag aaactttttt tggtttattt ctcatacagt			2131
gtattggcaa ctttggcaca ccagaatttg taaactccac cagtcctact ttagtgagat			2191
aaaaagcaca ctcttaatat tcttccttgt tgctttcaag tagttagagt tgagctgtta			2251
aggacagaat aaaatcatag ttgaggacag caggttttag ttgaattgaa aatttgactg			2311
ctctgcccc tagaatgtgt gtattttaag catatgtagc taatctcttg tgttgtaaa			2371
ctataactgt ttcataattt tcttttgaca aagtagccaa agacaatcag cagaaagcat			2431
tttctgcaaa ataaacgcaa tatgcaaaat gtgattcgtc cagttattag tgaagccct			2491
ccttttgtga gtatttactg tttattg			2518

<210> 2
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 627 979 T3

Met	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg	1	5	10	15
Val	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Asn	Glu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ser	20	25	30	
Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Arg	Val	Gly	Leu	Glu	Glu	35	40	45	
Ser	Glu	Leu	Trp	Leu	Arg	Phe	Lys	Glu	Leu	Thr	Asn	Glu	Met	Ile	Val	50	55	60	
Thr	Lys	Asn	Gly	Arg	Arg	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Asn	Val	Ser	65	70	75	80
Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Ala	Met	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Asp	Phe	Val	Ala	85	90	95	
Ala	Asp	Asn	His	Arg	Trp	Lys	Tyr	Val	Asn	Gly	Glu	Trp	Val	Pro	Gly	100	105	110	
Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ser	Cys	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Asp	115	120	125	
Ser	Pro	Asn	Phe	Gly	Ala	His	Trp	Met	Lys	Ala	Pro	Val	Ser	Phe	Ser	130	135	140	
Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Met	Leu	145	150	155	160
Asn	Ser	Leu	His	Lys	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ile	His	Ile	Val	Arg	Val	Gly	165	170	175	
Gly	Pro	Gln	Arg	Met	Ile	Thr	Ser	His	Cys	Phe	Pro	Glu	Thr	Gln	Phe	180	185	190	
Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Lys	Ile	195	200	205	
Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Arg	Ser	210	215	220	
Asp	His	Lys	Glu	Met	Met	Glu	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gln	Gln	Pro	Gly	225	230	235	240

ES 2 627 979 T3

Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro
245 250 255

Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
260 265 270

Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
275 280 285

Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
290 295 300

Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
325 330 335

Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
340 345 350

Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Val Ser
355 360 365

Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
370 375 380

Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
385 390 395 400

Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
405 410 415

Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
420 425 430

Pro Ser Met
435

<210> 3

<211> 2046

5 <212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10 <222> (109)..(1419)

<400> 3

ES 2 627 979 T3

ggctccgcag agtgaccctt tttcttgga aagcgggtggc gagagaagtg aaggtggctg	60
ttgggtaggg agtcaagact cctggaaggt ggagaggggtg gcgggagg atg agc tcg	117
Met Ser Ser	
1	
ccg ggc aca gag agc gca ggg aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac	165
Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His	
5 10 15	
ctg ctc agc gcc gtg gag agc gag ctg cag gcg ggc agc gag aag gga	213
Leu Leu Ser Ala Val Glu Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly	
20 25 30 35	
gac ccc acc gaa cgc gaa ctg cga gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg	261
Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Leu Glu Glu Ser Glu Leu	
40 45 50	
tgg ctg cgc ttc aag gag cta act aac gag atg att gtg acc aag aac	309
Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn	
55 60 65	
ggc agg agg atg ttc ccg gtg ctg aag gta aat gtg tca ggc ctg gac	357
Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp	
70 75 80	
ccc aat gcc atg tac tct ttc ttg ctg gac ttc gtg acg gct gac aac	405
Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr Ala Asp Asn	
85 90 95	
cac cgc tgg aaa tat gtg aac ggg gag tgg gta cct ggg ggc aaa cca	453
His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro	
100 105 110 115	
gag cct cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac cca gac tcg ccc aat	501
Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn	
120 125 130	
ttt ggg gcc cac tgg atg aag gcg cct gtg tct ttc agc aaa gtc aaa	549
Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys	
135 140 145	
ctc acc aac aag ctc aat gga ggg gga cag atc atg tta aac tcc ttg	597
Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu	
150 155 160	
cat aag tat gaa cct cgg att cac atc gtg aga gtt ggg ggc ccg caa	645
His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly Gly Pro Gln	
165 170 175	
cgc atg atc acc agc cac tgc ttt ccc gag acc cag ttc ata gct gtg	693
Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val	
180 185 190 195	
act gcc tac cag aat gag gag att aca gcc ctt aaa att aaa tac aac	741
Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn	
200 205 210	
cca ttt gct aaa gcc ttc ctt gat gcc aaa gaa aga aac gac cac aaa	789
Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Asn Asp His Lys	
215 220 225	
gat gta atg gag gaa ccg ggg gac tgc cag cag ccg ggg tat tcc caa	837

ES 2 627 979 T3

Asp	Val	Met	Glu	Glu	Pro	Gly	Asp	Cys	Gln	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	
	230						235					240				
tgg	ggg	tgg	ctt	gtt	cct	ggt	gct	ggc	acc	ctc	tgc	ccg	cct	gcc	agc	885
Trp	Gly	Trp	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Thr	Leu	Cys	Pro	Pro	Ala	Ser	
	245					250					255					
tcc	cac	cct	cag	ttt	gga	ggc	tcg	ctc	tct	ctc	ccc	tcc	aca	cac	ggc	933
Ser	His	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Thr	His	Gly	
260					265					270					275	
tgt	gag	agg	tac	cca	gct	cta	agg	aac	cac	cgg	tca	tcg	ccc	tac	ccc	981
Cys	Glu	Arg	Tyr	Pro	Ala	Leu	Arg	Asn	His	Arg	Ser	Ser	Pro	Tyr	Pro	
			280						285					290		
agc	ccc	tat	gct	cat	cgg	aac	agc	tct	cca	acc	tat	gcg	gac	aat	tca	1029
Ser	Pro	Tyr	Ala	His	Arg	Asn	Ser	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asn	Ser	
			295				300						305			
tct	gct	tgt	ctg	tcc	atg	ctg	cag	tcc	cat	gat	aac	tgg	tct	agc	ctc	1077
Ser	Ala	Cys	Leu	Ser	Met	Leu	Gln	Ser	His	Asp	Asn	Trp	Ser	Ser	Leu	
	310					315						320				
gga	gtg	cct	ggc	cac	acc	agc	atg	ctg	cct	gtg	agt	cat	aac	gcc	agc	1125
Gly	Val	Pro	Gly	His	Thr	Ser	Met	Leu	Pro	Val	Ser	His	Asn	Ala	Ser	
	325					330					335					
cca	cct	act	ggc	tct	agc	cag	tat	ccc	agt	ctc	tgg	tct	gtg	agc	aat	1173
Pro	Pro	Thr	Gly	Ser	Pro	Gln	Tyr	Pro	Ser	Leu	Trp	Ser	Val	Ser	Asn	
340					345					350					355	
ggt	acc	atc	acc	cca	ggc	tcc	cag	aca	gct	ggg	gtg	tcc	aac	ggg	ctg	1221
Gly	Thr	Ile	Thr	Pro	Gly	Ser	Gln	Thr	Ala	Gly	Val	Ser	Asn	Gly	Leu	
			360						365					370		
gga	gct	cag	ttc	ttt	cga	ggc	tcc	cct	gca	cat	tac	aca	cca	ctg	acg	1269
Gly	Ala	Gln	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	His	Tyr	Thr	Pro	Leu	Thr	
		375						380					385			
cac	acg	gtc	tca	gct	gcc	acg	tcc	tcg	tct	tct	ggt	tct	ccg	atg	tat	1317
His	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Met	Tyr	
		390					395					400				
gaa	ggg	gct	gct	aca	gtc	aca	gac	att	tct	gac	agc	cag	tat	gac	acg	1365
Glu	Gly	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Asp	Ile	Ser	Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Thr	
	405					410					415					
gcc	caa	agc	ctc	ctc	ata	gcc	tcg	tgg	aca	cct	gtg	tca	ccc	cca	tct	1413
Ala	Gln	Ser	Leu	Leu	Ile	Ala	Ser	Trp	Thr	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	
420					425					430					435	
atg	tga	attgaacttt	cctccatgtg	ctgagacttg	taacaaccgg	tgtcaactgg										1469
Met																
atcttctagg	ctcaaagtgg	caggctcttg	ggacaaggga	aaaataaata	aataaaagct											1529
agatactaac	aactccatit	tcaaataaga	gcaataatac	atgtcctata	atcatgttct											1589
acagcctctt	gtttgatacc	tacagtagtg	atatgtgtcc	tacattatga	agccaaggac											1649
agagagacgg	ctgtggtcca	gttttttgtg	actggcagtt	aatcagagtc	ctttgctagg											1709
tagggtccta	tatcttgtgt	ttctctacaa	catatatgtg	actttgaaat	cctggaattc											1769
gtccaccccc	tgtcctactt	tagtgagaca	caaggtagac	ctctaagtgc	ctcccttggt											1829
gccttagagt	agttaacttt	gaggacagaa	aaaagcatag	ccagaagatt	gtaactgaac											1889
cgtcaactgt	tctgcccttg	gaacatgcct	actttaagca	cacgtagctt	tttgtgttgg											1949
gaagtcaact	gtatggatac	ttttctgttg	acaaagtagc	caaagacaat	ctgcagaaag											2009
tgttttctgc	acaataaagg	caatatatag	cacctgg													2046

<210> 4

<211> 436

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
1 5 10 15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser
20 25 30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
35 40 45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
50 55 60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
65 70 75 80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr
85 90 95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
100 105 110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
115 120 125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
130 135 140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
145 150 155 160

Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
165 170 175

10

ES 2 627 979 T3

Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
180 185 190

Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
195 200 205

Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Asn
210 215 220

Asp His Lys Asp Val Met Glu Glu Pro Gly Asp Cys Gln Gln Pro Gly
225 230 235 240

Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Val Pro Gly Ala Gly Thr Leu Cys Pro
245 250 255

Pro Ala Ser Ser His Pro Gln Phe Gly Gly Ser Leu Ser Leu Pro Ser
260 265 270

Thr His Gly Cys Glu Arg Tyr Pro Ala Leu Arg Asn His Arg Ser Ser
275 280 285

Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Ser Ser Pro Thr Tyr Ala
290 295 300

Asp Asn Ser Ser Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Val Pro Gly His Thr Ser Met Leu Pro Val Ser His
325 330 335

Asn Ala Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
340 345 350

Val Ser Asn Gly Thr Ile Thr Pro Gly Ser Gln Thr Ala Gly Val Ser
355 360 365

Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
370 375 380

Pro Leu Thr His Thr Val Ser Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ser
385 390 395 400

Pro Met Tyr Glu Gly Ala Ala Thr Val Thr Asp Ile Ser Asp Ser Gln
405 410 415

Tyr Asp Thr Ala Gln Ser Leu Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser
420 425 430

Pro Pro Ser Met
435

5 <210> 5
<211> 1305
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> CDS

<222> (1)..(1305)

<400> 5

atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc ctg cag tac cga	48
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg	
1 5 10 15	
gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg cag gcg ggc agc	96
Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser	
20 25 30	
gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg ggc ctg gag gag	144
Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu	
35 40 45	
agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat gag atg atc gtg	192
Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val	
50 55 60	
acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag gtg aac gtg tct	240
Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser	
65 70 75 80	
ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg	288
Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala	
85 90 95	
gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg	336
Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly	
100 105 110	
ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac ccc gac	384
Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp	
115 120 125	
tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc gtc tcc ttc agc	432
Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser	
130 135 140	
aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc cag atc atg ctg	480
Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu	
145 150 155 160	
aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata gtg aga gtt ggg	528
Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly	
165 170 175	
gat cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct gag acc cag ttc	576
Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe	

5

ES 2 627 979 T3

180	185	190	
ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca gct ctt aaa att Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile 195 200 205			624
aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca aag gaa aga agt Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser 210 215 220			672
gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly 225 230 235 240			720
tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc ctg tgt cca Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro 245 250 255			768
cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc Pro Ala Asn His Pro Gln Phe Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser 260 265 270			816
acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser 275 280 285			864
ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser 290 295 300			912
gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Ser His Asp Asn Trp 305 310 315 320			960
tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His 325 330 335			1008
aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct Asn Ala Ser Pro Thr Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser 340 345 350			1056
gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Val Thr 355 360 365			1104
aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc ccg ggc tcc ccc gcg cac tac aca Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr 370 375 380			1152
ccc ctc acc cat ccg gtc tgc gca ccc tct tcc tcg gga tcc cca ctg Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu 385 390 395 400			1200
tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp 405 410 415			1248
gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tcg cca Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro 420 425 430			1296
cct tcc atg			1305
Pro Ser Met 435			

5 <210> 6
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

ES 2 627 979 T3

Met	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg	1	5	10	15
Val	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Asn	Glu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ser	20	25	30	
Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Arg	Val	Gly	Leu	Glu	Glu	35	40	45	
Ser	Glu	Leu	Trp	Leu	Arg	Phe	Lys	Glu	Leu	Thr	Asn	Glu	Met	Ile	Val	50	55	60	
Thr	Lys	Asn	Gly	Arg	Arg	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Asn	Val	Ser	65	70	75	80
Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Ala	Met	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Asp	Phe	Val	Ala	85	90	95	
Ala	Asp	Asn	His	Arg	Trp	Lys	Tyr	Val	Asn	Gly	Glu	Trp	Val	Pro	Gly	100	105	110	
Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ser	Cys	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Asp	115	120	125	
Ser	Pro	Asn	Phe	Gly	Ala	His	Trp	Met	Lys	Ala	Pro	Val	Ser	Phe	Ser	130	135	140	
Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Met	Leu	145	150	155	160
Asn	Ser	Leu	His	Lys	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ile	His	Ile	Val	Arg	Val	Gly	165	170	175	
Asp	Pro	Gln	Arg	Met	Ile	Thr	Ser	His	Cys	Phe	Pro	Glu	Thr	Gln	Phe	180	185	190	
Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Lys	Ile	195	200	205	

ES 2 627 979 T3

Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser
 210 215 220
 Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly
 225 230 235 240
 Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro
 245 250 255
 Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270
 Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
 290 295 300
 Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Val Thr
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
 405 410 415
 Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
 420 425 430
 Pro Ser Met
 435

<210> 7
 <211> 1357
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> CDS
 <222> (10)..(1347)

ES 2 627 979 T3

<400> 7

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg	51
Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala	
1 5 10	
gga aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag	99
Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu	
15 20 25 30	
aat gag ctg cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa	147
Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu	
35 40 45	
ctg cgc gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag	195
Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu	
50 55 60	
ctc acc aat gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg	243
Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro	
65 70 75	
gtg ctg aag gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc	291
Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser	
80 85 90	
ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg	339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val	
95 100 105 110	
aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc	387
Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser	
115 120 125	
tgc gtc tac atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg	435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met	
130 135 140	
aag gct ccc gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac	483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn	
145 150 155	
gga ggg ggc cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga	531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg	
160 165 170	
atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag cgc atg atc acc agc cac	579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His	
175 180 185 190	
tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag	627
Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu	
195 200 205	

ES 2 627 979 T3

gag atc aca gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe 210 215 220	675
ctt gat gca aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro 225 230 235	723
gga gac agc cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro 240 245 250	771
gga acc agc acc ctg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly 255 260 265 270	819
ggg gcc ctc tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr 275 280 285	867
ctg agg agc cac cgg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg 290 295 300	915
aac aat tct cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asn Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met 305 310 315	963
ctg caa tcc cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro 320 325 330	1011
agc atg ctc ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser 335 340 345 350	1059
cag tac ccc agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly 355 360 365	1107
tcc cag gca gca gcc gtg acc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc ccg Ser Gln Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg 370 375 380	1155
ggc tcc ccc gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gca ccc Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro 385 390 395	1203
tct tcc tcg gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn 400 405 410	1251
atc gtg gac agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala 415 420 425 430	1299
tca tgg aca cct gtg tcg cca cct tcc atg cat cac cat cac cat cac Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His 435 440 445	1347
tgagactagt	1357

<210> 8
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

ES 2 627 979 T3

Met	Ala	Asp	Glu	Ala	Pro	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Ala	Gly	Lys	1	5	10	15
Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg	Val	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Asn	Glu	20	25	30	
Leu	Gln	Ala	Gly	Ser	Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Arg	35	40	45	
Val	Gly	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Leu	Trp	Leu	Arg	Phe	Lys	Glu	Leu	Thr	50	55	60	
Asn	Glu	Met	Ile	Val	Thr	Lys	Asn	Gly	Arg	Arg	Met	Phe	Pro	Val	Leu	65	70	75	80
Lys	Val	Asn	Val	Ser	Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Ala	Met	Tyr	Ser	Phe	Leu	85	90	95	
Leu	Asp	Phe	Val	Ala	Ala	Asp	Asn	His	Arg	Trp	Lys	Tyr	Val	Asn	Gly	100	105	110	
Glu	Trp	Val	Pro	Gly	Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ser	Cys	Val	115	120	125	
Tyr	Ile	His	Pro	Asp	Ser	Pro	Asn	Phe	Gly	Ala	His	Trp	Met	Lys	Ala	130	135	140	
Pro	Val	Ser	Phe	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	145	150	155	160
Gly	Gln	Ile	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	His	Lys	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ile	His	165	170	175	
Ile	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Pro	Gln	Arg	Met	Ile	Thr	Ser	His	Cys	Phe	180	185	190	
Pro	Glu	Thr	Gln	Phe	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Glu	Glu	Ile	195	200	205	
Thr	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp				

ES 2 627 979 T3

210	215	220
Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp		
225	230	235 240
Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr		
	245	250 255
Ser Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala		
	260	265 270
Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg		
	275	280 285
Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn		
	290	295 300
Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln		
	305	310 315 320
Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met		
	325	330 335
Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr		
	340	345 350
Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln		
	355	360 365
Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser		
	370	375 380
Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser		
	385	390 395 400
Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val		
	405	410 415
Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp		
	420	425 430
Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His		
	435	440 445

<210> 9
 <211> 1360
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> CDS
 <222> (10)..(1353)

<400> 9

ES 2 627 979 T3

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcg ccg ggc aca gag agc gca	51
Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala	
1 5 10	
ggg aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctc agc gcc gtg gag	99
Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu	
15 20 25 30	
agc gag ctg cag gcg ggc agc gag aag gga gac ccc acc gaa cgc gaa	147
Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu	
35 40 45	
ctg cga gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag	195
Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu	
50 55 60	
cta act aac gag atg att gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttc ccg	243
Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro	
65 70 75	
gtg ctg aag gta aat gtg tca ggc ctg gac ccc aat gcc atg tac tct	291
Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser	
80 85 90	
ttc ttg ctg gac ttc gtg acg gct gac aac cac cgc tgg aaa tat gtg	339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val	
95 100 105 110	
aac ggg gag tgg gta cct ggg ggc aaa cca gag cct cag gcg ccc agc	387
Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser	
115 120 125	
tgc gtc tac atc cac cca gac tcg ccc aat ttt ggg gcc cac tgg atg	435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met	
130 135 140	
aag gcg cct gtg tct ttc agc aaa gtc aaa ctc acc aac aag ctc aat	483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn	
145 150 155	
gga ggg gga cag atc atg tta aac tcc ttg cat aag tat gaa cct cgg	531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg	
160 165 170	
att cac atc gtg aga gtt ggg ggc ccg caa cgc atg atc acc agc cac	579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His	
175 180 185 190	
tgc ttt ccc gag acc cag ttc ata gct gtg act gcc tac cag aat gag	627
Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu	
195 200 205	
gag att aca gcc ctt aaa att aaa tac aac cca ttt gct aaa gcc ttc	675

ES 2 627 979 T3

Glu Ile Thr	Ala Leu Lys	Ile Lys Tyr	Asn Pro Phe	Ala Lys Ala	Phe	
	210		215	220		
ctt gat gcc	aaa gaa aga	aac gac cac	aaa gat gta	atg gag gaa	ccg	723
Leu Asp Ala	Lys Glu Arg	Asn Asp His	Lys Asp Val	Met Glu Glu	Pro	
	225		230	235		
ggg gac tgc	cag cag ccg	ggg tat tcc	caa tgg ggg	tgg ctt gtt	cct	771
Gly Asp Cys	Gln Gln Pro	Gly Tyr Ser	Gln Trp Gly	Trp Leu Val	Pro	
	240		245	250		
ggt gct ggc	acc ctc tgc	ccg cct gcc	agc tcc cac	cct cag ttt	gga	819
Gly Ala Gly	Thr Leu Cys	Pro Pro Ala	Ser Ser His	Pro Gln Phe	Gly	
	255		260	265	270	
ggc tcg ctc	tct ctc ccc	tcc aca cac	ggc tgt gag	agg tac cca	gct	867
Gly Ser Leu	Ser Leu Pro	Ser Thr His	Gly Cys Glu	Arg Tyr Pro	Ala	
	275		280	285		
cta agg aac	cac cgg tca	tcg ccc tac	ccc agc ccc	tat gct cat	cgg	915
Leu Arg Asn	His Arg Ser	Ser Pro Tyr	Pro Ser Pro	Tyr Ala His	Arg	
	290		295	300		
aac agc tct	cca acc tac	gcg gac aat	tca tct gct	tgt ctg tcc	atg	963
Asn Ser Ser	Pro Thr Tyr	Ala Asp Asn	Ser Ser Ala	Cys Leu Ser	Met	
	305		310	315		
ctg cag tcc	cat gat aac	tgg tct agc	ctc gga gtg	cct ggc cac	acc	1011
Leu Gln Ser	His Asp Asn	Trp Ser Ser	Leu Gly Val	Pro Gly His	Thr	
	320		325	330		
agc atg ctg	cct gtg agt	cat aac gcc	agc cca cct	act ggc tct	agc	1059
Ser Met Leu	Pro Val Ser	His Asn Ala	Ser Pro Pro	Thr Gly Ser	Ser	
	335		340	345	350	
cag tat ccc	agt ctc tgg	tct gtg agc	aat ggt acc	atc acc cca	ggc	1107
Gln Tyr Pro	Ser Leu Trp	Ser Val Ser	Asn Gly Thr	Ile Thr Pro	Gly	
	355		360	365		
tcc cag aca	gct ggg gtg	tcc aac ggg	ctg gga gct	cag ttc ttt	cga	1155
Ser Gln Thr	Ala Gly Val	Ser Asn Gly	Leu Gly Ala	Gln Phe Phe	Arg	
	370		375	380		
ggc tcc cct	gca cat tac	aca cca ctg	aca cac acg	gtc tca gct	gcc	1203
Gly Ser Pro	Ala His Tyr	Thr Pro Leu	Thr His Thr	Val Ser Ala	Ala	
	385		390	395		
acg tcc tcg	tct tct ggt	tct ccg atg	tat gaa ggg	gct gct aca	gtc	1251
Thr Ser Ser	Ser Ser Gly	Pro Met Tyr	Glu Gly Ala	Ala Ala Thr	Val	
	400		405	410		
aca gac att	tct gac agc	cag tat gac	acg gcc caa	agc ctc ctc	ata	1299
Thr Asp Ile	Ser Asp Ser	Gln Tyr Asp	Thr Ala Gln	Ser Leu Leu	Ile	
	415		420	425	430	
gcc tcg tgg	aca cct gtg	tca ccc cca	tct atg cat	cac cat cac	cat	1347
Ala Ser Trp	Thr Pro Val	Ser Pro Pro	Ser Met His	His His His	His	
	435		440	445		
cac tga gactagt						1360
His						

<210> 10
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

ES 2 627 979 T3

Met	Ala	Asp	Glu	Ala	Pro	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Ala	Gly	Lys	1	5	10	15
Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg	Val	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Ser	Glu	20	25	30	
Leu	Gln	Ala	Gly	Ser	Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Arg	35	40	45	
Val	Gly	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Leu	Trp	Leu	Arg	Phe	Lys	Glu	Leu	Thr	50	55	60	
Asn	Glu	Met	Ile	Val	Thr	Lys	Asn	Gly	Arg	Arg	Met	Phe	Pro	Val	Leu	65	70	75	80
Lys	Val	Asn	Val	Ser	Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Ala	Met	Tyr	Ser	Phe	Leu	85	90	95	
Leu	Asp	Phe	Val	Thr	Ala	Asp	Asn	His	Arg	Trp	Lys	Tyr	Val	Asn	Gly	100	105	110	
Glu	Trp	Val	Pro	Gly	Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ser	Cys	Val	115	120	125	
Tyr	Ile	His	Pro	Asp	Ser	Pro	Asn	Phe	Gly	Ala	His	Trp	Met	Lys	Ala	130	135	140	
Pro	Val	Ser	Phe	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	145	150	155	160
Gly	Gln	Ile	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	His	Lys	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ile	His	165	170	175	
Ile	Val	Arg	Val	Gly	Gly	Pro	Gln	Arg	Met	Ile	Thr	Ser	His	Cys	Phe	180	185	190	
Pro	Glu	Thr	Gln	Phe	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Glu	Glu	Ile	195	200	205	

ES 2 627 979 T3

Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp
210 215 220

Ala Lys Glu Arg Asn Asp His Lys Asp Val Met Glu Glu Pro Gly Asp
225 230 235 240

Cys Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Val Pro Gly Ala
245 250 255

Gly Thr Leu Cys Pro Pro Ala Ser Ser His Pro Gln Phe Gly Gly Ser
260 265 270

Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Gly Cys Glu Arg Tyr Pro Ala Leu Arg
275 280 285

Asn His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Ser
290 295 300

Ser Pro Thr Tyr Ala Asp Asn Ser Ser Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln
305 310 315 320

Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Val Pro Gly His Thr Ser Met
325 330 335

Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser Gln Tyr
340 345 350

Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Thr Ile Thr Pro Gly Ser Gln
355 360 365

Thr Ala Gly Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser
370 375 380

Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Thr Val Ser Ala Ala Thr Ser
385 390 395 400

Ser Ser Ser Gly Ser Pro Met Tyr Glu Gly Ala Ala Thr Val Thr Asp
405 410 415

Ile Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Thr Ala Gln Ser Leu Leu Ile Ala Ser
420 425 430

Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His
435 440 445

<210> 11

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<400> 11

Met Ala Asp Glu Ala Pro

1

5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 12

 Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu
 1 5
 10
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 13

 Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val
 1 5
 20
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 14

 Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val
 1 5
 30
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 15

 Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val
 1 5
 40
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

 Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val
 1 5 10
 45
 <210> 17
 <211> 1305
 50 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética
 55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1305)
 60 <400> 17

ES 2 627 979 T3

atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc ctg cag tac cga Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg 1 5 10 15	48
gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg cag gcg ggc agc Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser 20 25 30	96
gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg ggc ctg gag gag Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu 35 40 45	144
agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat gag atg atc gtg Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val 50 55 60	192
acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag gtg aac gtg tct Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser 65 70 75 80	240
ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala 85 90 95	288
gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly 100 105 110	336
ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac ccc gac Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp 115 120 125	384
tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc gtc tcc ttc agc Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser 130 135 140	432
aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc cag atc atg ctg Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gln Ile Met Leu 145 150 155 160	480
aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata gtg aga gtt ggg Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly 165 170 175	528
gat cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct gag acc cag ttc Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe	576

ES 2 627 979 T3

180	185	190	
ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca gct ctt aaa att Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile 195 200 205			624
aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca aag gaa aga agt Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser 210 215 220			672
gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly 225 230 235 240			720
tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc gtg tgt cca Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val Cys Pro 245 250 255			768
cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser 260 265 270			816
acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser 275 280 285			864
ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser 290 295 300			912
gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Ser His Asp Asn Trp 305 310 315 320			960
tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His 325 330 335			1008
aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct Asn Ala Ser Pro Thr Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser 340 345 350			1056
gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Val Thr 355 360 365			1104
aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc ccg ggc tcc ccc gcg cac tac aca Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr 370 375 380			1152
ccc ctc acc cat ccg gtc tgc gca ccc tct tcc tcg gga tcc cca ctg Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu 385 390 395 400			1200
tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp 405 410 415			1248
gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tcg cca Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro 420 425 430			1296
cct tcc atg			1305
Pro Ser Met 435			

5 <210> 18
<211> 435
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

ES 2 627 979 T3

<400> 18

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
1 5 10 15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
20 25 30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
35 40 45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
50 55 60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
65 70 75 80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
85 90 95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
100 105 110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
115 120 125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
130 135 140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
145 150 155 160

Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
165 170 175

Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
180 185 190

Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile

5

ES 2 627 979 T3

195					200					205					
Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Arg	Ser
210						215				220					
Asp	His	Lys	Glu	Met	Met	Glu	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gln	Gln	Pro	Gly
225					230					235					240
Tyr	Ser	Gln	Trp	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Val	Cys	Pro
				245					250					255	
Pro	Ala	Asn	Pro	His	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser
			260					265					270		
Thr	His	Ser	Cys	Asp	Arg	Tyr	Pro	Thr	Leu	Arg	Ser	His	Arg	Ser	Ser
		275					280					285			
Pro	Tyr	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ala	His	Arg	Asn	Asn	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ser
	290						295				300				
Asp	Asn	Ser	Pro	Ala	Cys	Leu	Ser	Met	Leu	Gln	Ser	His	Asp	Asn	Trp
305					310					315					320
Ser	Ser	Leu	Gly	Met	Pro	Ala	His	Pro	Ser	Met	Leu	Pro	Val	Ser	His
				325					330					335	
Asn	Ala	Ser	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Gln	Tyr	Pro	Ser	Leu	Trp	Ser
			340					345					350		
Val	Ser	Asn	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Gly	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Val	Thr
		355					360					365			
Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	His	Tyr	Thr
	370					375					380				
Pro	Leu	Thr	His	Pro	Val	Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Leu
385					390					395					400
Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Asn	Ile	Val	Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp
			405					410						415	
Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Arg	Leu	Ile	Ala	Ser	Trp	Thr	Pro	Val	Ser	Pro
			420					425					430		
Pro	Ser	Met													
		435													

<210> 19
 <211> 1370
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> CDS

ES 2 627 979 T3

<222> (10)..(1350)

<400> 19

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg	51
Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala	
1 5 10	
gga aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag	99
Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu	
15 20 25 30	
aat gag ctg cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa	147
Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu	
35 40 45	
ctg cgc gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag	195
Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu	
50 55 60	
ctc acc aat gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg	243
Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro	
65 70 75	
gtg ctg aag gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc	291
Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser	
80 85 90	
ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg	339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val	
95 100 105 110	
aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc	387
Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser	
115 120 125	
tgc gtc tac atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg	435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met	
130 135 140	
aag gct ccc gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac	483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn	
145 150 155	
gga ggg ggc cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga	531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg	
160 165 170	
atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag cgc atg atc acc agc cac	579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His	
175 180 185 190	
5 tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag	627

ES 2 627 979 T3

Cys	Phe	Pro	Glu	Thr	Gln	Phe	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Glu		
				195					200					205			
gag	atc	aca	gct	ctt	aaa	att	aag	tac	aat	cca	ttt	gca	aaa	gct	ttc		675
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe		
			210					215					220				
ctt	gat	gca	aag	gaa	aga	agt	gat	cac	aaa	gag	atg	atg	gag	gaa	ccc		723
Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Arg	Ser	Asp	His	Lys	Glu	Met	Met	Glu	Glu	Pro		
		225					230					235					
gga	gac	agc	cag	caa	cct	ggg	tac	tcc	caa	tgg	ggg	tgg	ctt	ctt	cct		771
Gly	Asp	Ser	Gln	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	Trp	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro		
	240					245					250						
gga	acc	agc	acc	gtg	tgt	cca	cct	gca	aat	cct	cat	cct	cag	ttt	gga		819
Gly	Thr	Ser	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	Ala	Asn	Pro	His	Pro	Gln	Phe	Gly		
	255				260					265					270		
ggg	gcc	ctc	tcc	ctc	ccc	tcc	acg	cac	agc	tgt	gac	agg	tac	cca	acc		867
Gly	Ala	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Thr	His	Ser	Cys	Asp	Arg	Tyr	Pro	Thr		
				275					280					285			
ctg	agg	agc	cac	cgg	tcc	tca	ccc	tac	ccc	agc	ccc	tat	gct	cat	cgg		915
Leu	Arg	Ser	His	Arg	Ser	Ser	Pro	Tyr	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ala	His	Arg		
			290					295					300				
aac	aat	tct	cca	acc	tat	tct	gac	aac	tca	cct	gca	tgt	tta	tcc	atg		963
Asn	Asn	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ser	Pro	Ala	Cys	Leu	Ser	Met		
		305					310					315					
ctg	caa	tcc	cat	gac	aat	tgg	tcc	agc	ctt	gga	atg	cct	gcc	cat	ccc		1011
Leu	Gln	Ser	His	Asp	Asn	Trp	Ser	Ser	Leu	Gly	Met	Pro	Ala	His	Pro		
		320				325					330						
agc	atg	ctc	ccc	gtg	agc	cac	aat	gcc	agc	cca	cct	acc	agc	tcc	agt		1059
Ser	Met	Leu	Pro	Val	Ser	His	Asn	Ala	Ser	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser		
	335				340				345					350			
cag	tac	ccc	agc	ctg	tgg	tct	gtg	agc	aac	ggc	gcc	gtc	acc	ccg	ggc		1107
Gln	Tyr	Pro	Ser	Leu	Trp	Ser	Val	Ser	Asn	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Gly		
				355					360					365			
tcc	cag	gca	gca	gcc	gtg	acc	aac	ggg	ctg	ggg	gcc	cag	ttc	ttc	cgg		1155
Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Phe	Phe	Arg		
			370					375					380				
ggc	tcc	ccc	gcg	cac	tac	aca	ccc	ctc	acc	cat	ccg	gtc	tcg	gca	ccc		1203
Gly	Ser	Pro	Ala	His	Tyr	Thr	Pro	Leu	Thr	His	Pro	Val	Ser	Ala	Pro		
		385					390					395					
tct	tcc	tcg	gga	tcc	cca	ctg	tac	gaa	ggg	gcg	gcc	gcg	gcc	aca	aac		1251
Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Asn		
		400				405				410							
atc	gtg	gac	agc	cag	tac	gac	gcc	gca	gcc	caa	ggc	cgc	ctc	ata	gcc		1299
Ile	Val	Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Arg	Leu	Ile	Ala		
	415				420					425					430		
tca	tgg	aca	cct	gtg	tcg	cca	cct	tcc	atg	cat	cac	cat	cac	cat	cac		1347
Ser	Trp	Thr	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Met	His	His	His	His	His	His		
				435				440						445			
tga	gactag	cccc	ggg	ggg	ccgc												1370

5 <210> 20
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 627 979 T3

<400> 20

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys
1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu
20 25 30

Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg
35 40 45

Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr
50 55 60

Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu
65 70 75 80

Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu
85 90 95

Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly
100 105 110

Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val
115 120 125

Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala
130 135 140

Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His
165 170 175

Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe
180 185 190

Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile
195 200 205

ES 2 627 979 T3

Thr	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	210	215	220	
Ala	Lys	Glu	Arg	Ser	Asp	His	Lys	Glu	Met	Met	Glu	Glu	Pro	Gly	Asp	225	230	235	240
Ser	Gln	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	Trp	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	245	250	255	
Ser	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	Ala	Asn	Pro	His	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Ala	260	265	270	
Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Thr	His	Ser	Cys	Asp	Arg	Tyr	Pro	Thr	Leu	Arg	275	280	285	
Ser	His	Arg	Ser	Ser	Pro	Tyr	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ala	His	Arg	Asn	Asn	290	295	300	
Ser	Pro	Thr	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ser	Pro	Ala	Cys	Leu	Ser	Met	Leu	Gln	305	310	315	320
Ser	His	Asp	Asn	Trp	Ser	Ser	Leu	Gly	Met	Pro	Ala	His	Pro	Ser	Met	325	330	335	
Leu	Pro	Val	Ser	His	Asn	Ala	Ser	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Gln	Tyr	340	345	350	
Pro	Ser	Leu	Trp	Ser	Val	Ser	Asn	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Gly	Ser	Gln	355	360	365	
Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	370	375	380	
Pro	Ala	His	Tyr	Thr	Pro	Leu	Thr	His	Pro	Val	Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	385	390	395	400
Ser	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Asn	Ile	Val	405	410	415	
Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Arg	Leu	Ile	Ala	Ser	Trp	420	425	430	
Thr	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Met	His	His	His	His	His	His			435	440	445	

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunoterapéutica que comprende:
 - a) un vehículo de levadura; y
 - (b) un antígeno de cáncer que comprende al menos un antígeno Brachyury.
- 5 para su uso en un método para reducir, detener, invertir, retrasar o prevenir el avance metastático del cáncer en un individuo que tiene cáncer.
2. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde la expresión de Brachyury no se detecta en el cáncer del individuo en el momento en el que se administra en primer lugar la composición.
- 10 3. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde la expresión de Brachyury se detecta en el cáncer del individuo en el momento en el que se administra en primer lugar la composición.
4. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el individuo tiene cáncer de estadio I, tiene cáncer de estadio II, tiene cáncer de estadio III o tiene cáncer de estadio IV.
5. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el individuo se está tratando o se ha tratado con otra terapia para el cáncer.
- 15 6. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde la terapia es quimioterapia, terapia dirigida contra el cáncer, terapia de radiación, transferencia adoptiva de linfocitos T o resección quirúrgica de un tumor del individuo.
7. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde la terapia es la administración de una o más composiciones inmunoterapéuticas adicionales.
- 20 8. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 7, en donde las composiciones inmunoterapéuticas adicionales comprenden un vehículo de levadura y un segundo antígeno de cáncer que no incluye antígeno Brachyury.
9. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 8, en donde el segundo antígeno de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: Ras mutado, antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, hTERT, p73, B-RAF, poliposis adenomatosa del colon (APC), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógeno (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina, y NGEF.
- 25 10. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, y cánceres metastáticos de los mismos.
- 30 11. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antígeno Brachyury tiene una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:2.
- 35 12. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antígeno Brachyury tiene una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a las SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:2.
- 40 13. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antígeno Brachyury tiene una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:2.
- 45 14. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el antígeno Brachyury comprende las posiciones 246 a 254 de la SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:2.
15. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el antígeno Brachyury comprende las posiciones 246 a 254 de la SEQ ID NO:18.
- 50 16. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el

antígeno Brachyury comprende una sustitución de una leucina en la posición 254 por una valina de SEQ ID NO:18.

17. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antígeno Brachyury comprende la SEQ ID NO:18, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:18, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a las SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:6, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a las SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:2, posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO:2.
18. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:18, al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:6, o al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:2.
19. La composición inmunoterapéutica para su uso según las reivindicaciones 1 a 18, en donde el antígeno de cáncer es una proteína de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:20 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:20.
20. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 19, en donde la expresión de la proteína de fusión está bajo el control del promotor *CUP1*.
21. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde el vehículo de levadura es una levadura entera aniquilada.
22. La composición inmunoterapéutica para su uso según la reivindicación 21, en donde la levadura entera está inactivada por calor.
23. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde el vehículo de levadura expresa el antígeno.
24. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la levadura es de *Saccharomyces cerevisiae*.
25. La composición inmunoterapéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la composición se formula en un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para su administración a un sujeto.
26. Una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury, en donde la composición inmunoterapéutica comprende:
 - a) un vehículo de levadura;
 - b) un antígeno expresado por el vehículo de levadura y que comprende al menos un antígeno Brachyury, en donde el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO:18 e incluye una sustitución de una leucina en la posición 254 por una valina; y
 - c) un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para su administración a un ser humano.
27. La composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la reivindicación 26, en donde el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:18.
28. La composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la reivindicación 26, en donde el antígeno Brachyury comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:18.
29. La composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de la reivindicación 26, en donde el antígeno Brachyury comprende las posiciones 2-435 de la SEQ ID NO:18.
30. Una composición inmunoterapéutica de levadura-Brachyury de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29 para su uso para tratar una enfermedad.

FIG. 1A

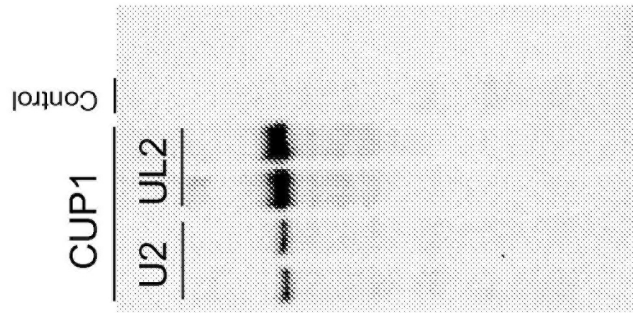


FIG. 1B

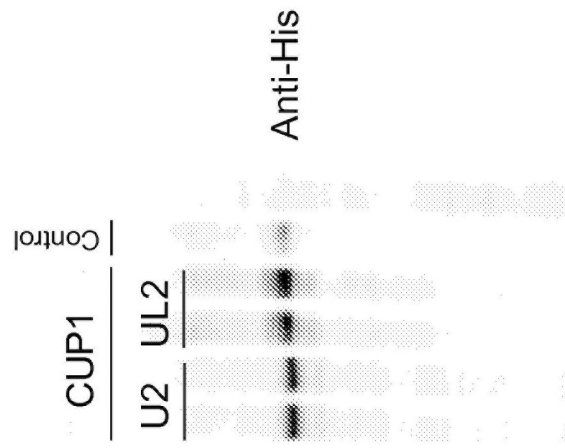


FIG. 1C

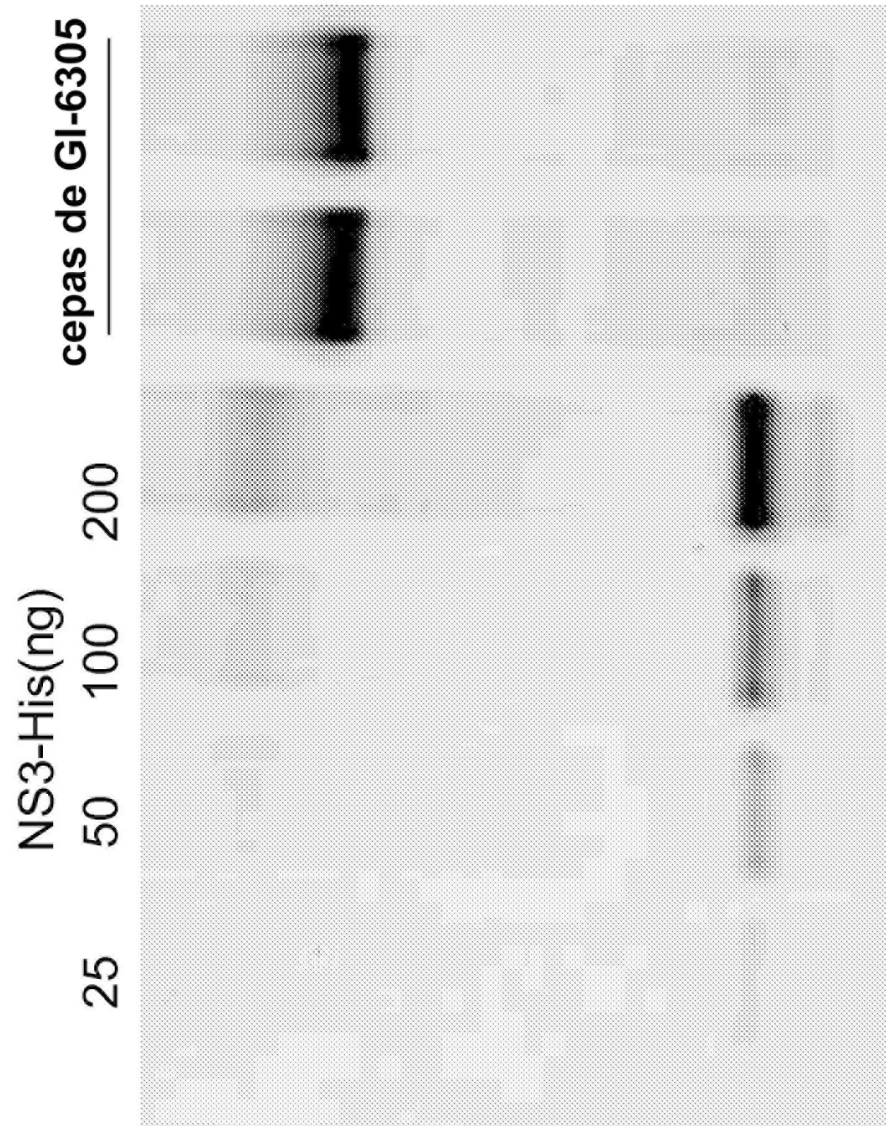
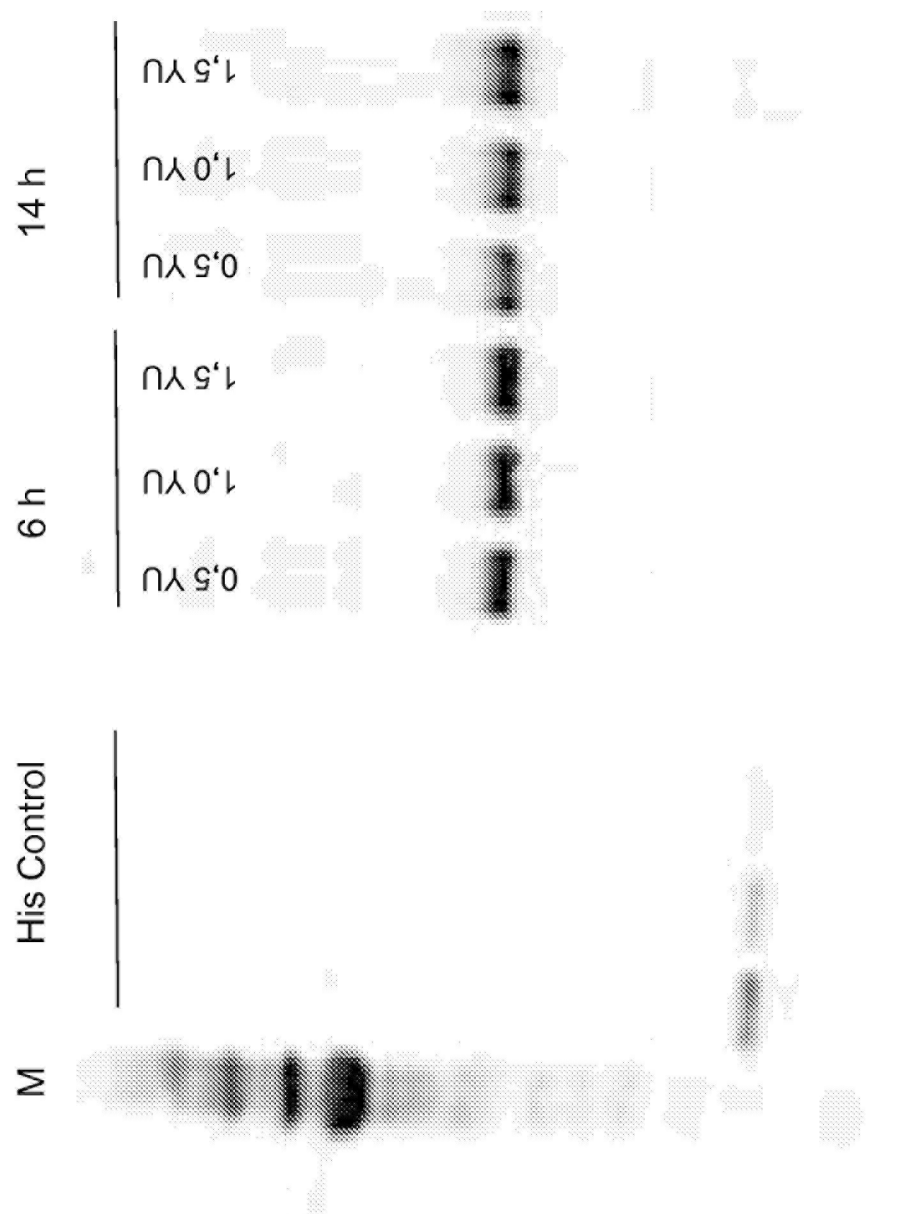


FIG. 2



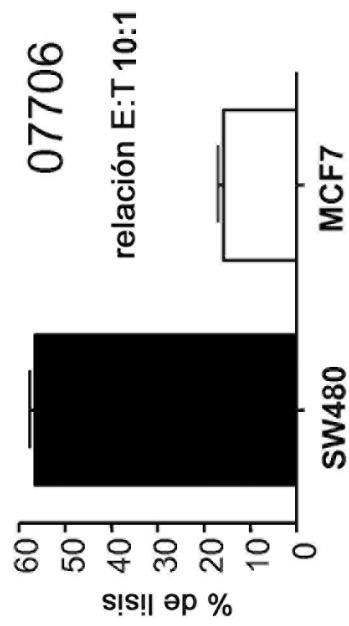


FIG. 3A

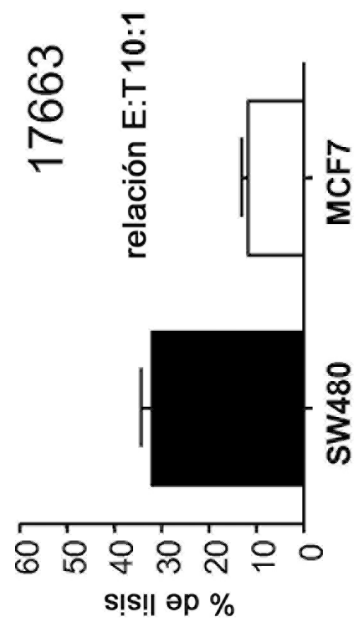


FIG. 3B

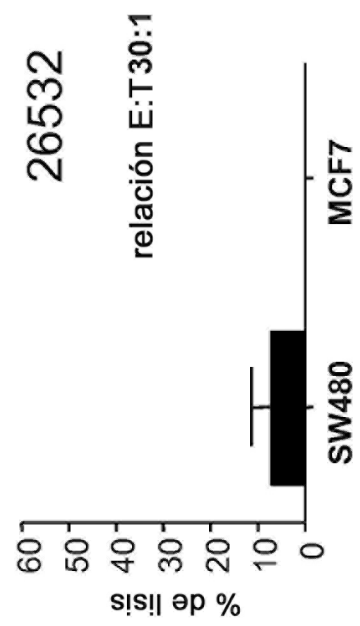


FIG. 3C

FIG. 4A

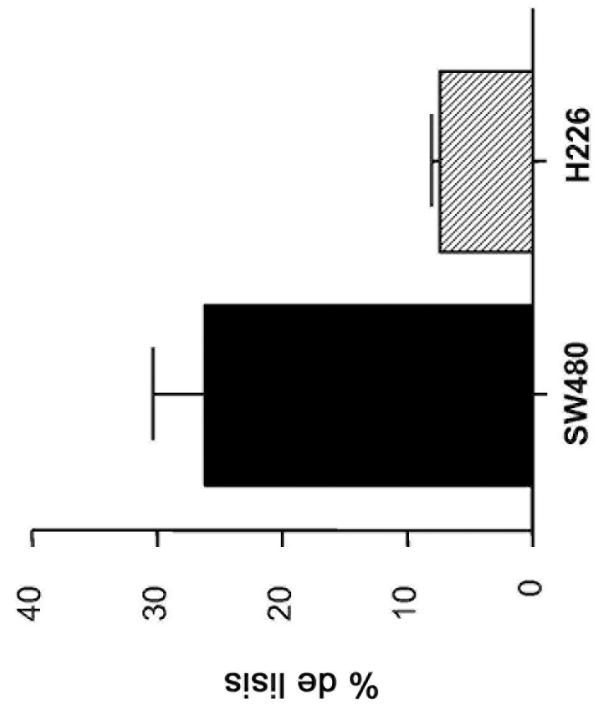


FIG. 4B

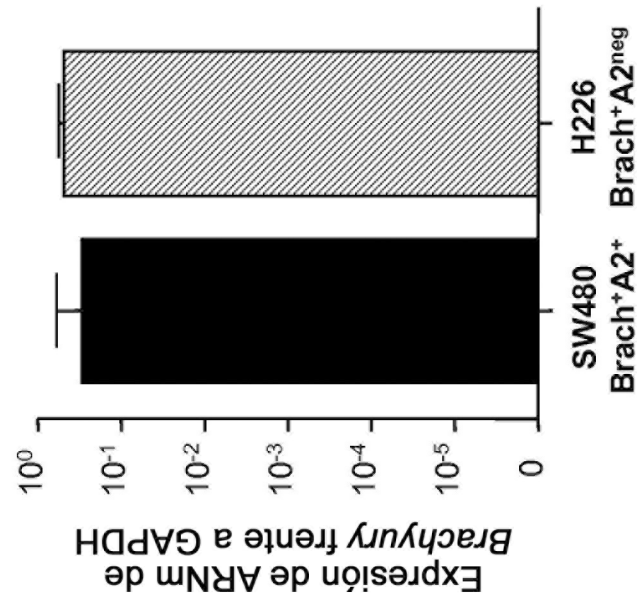


FIG. 5

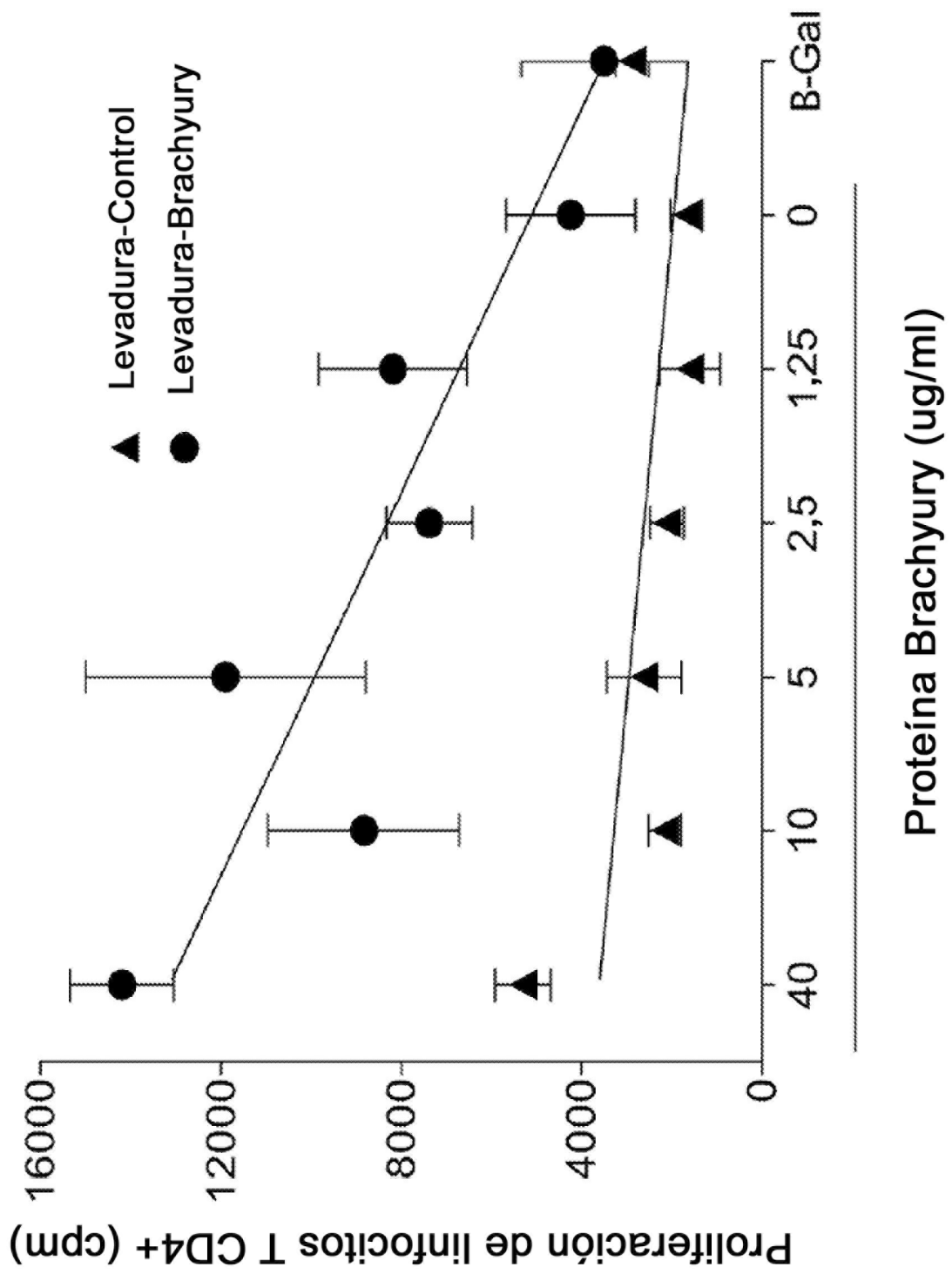


FIG. 7B

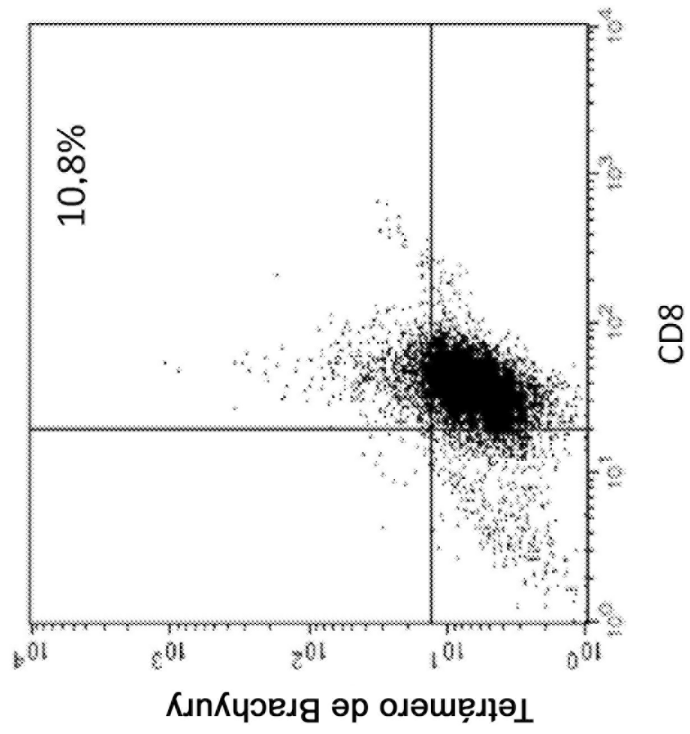


FIG. 7A

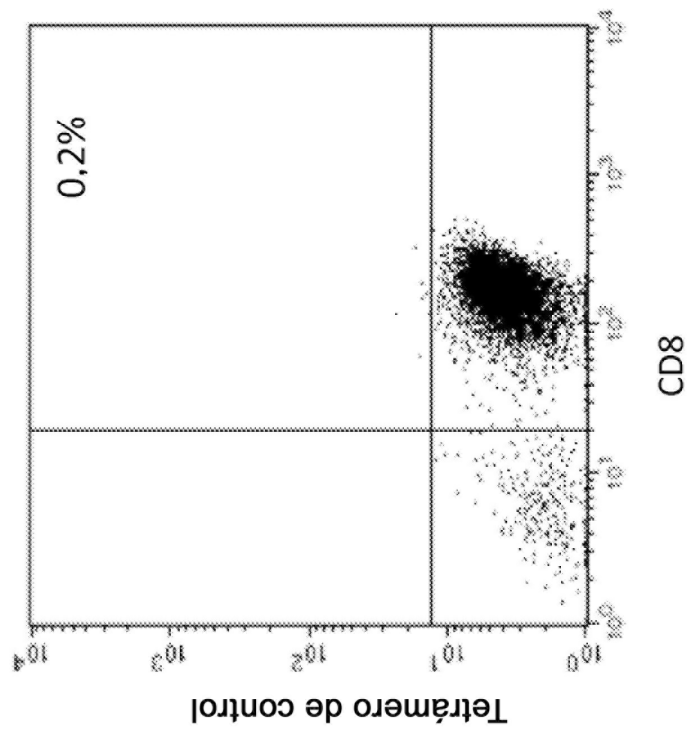


FIG. 8

